

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO
VALPROICO Y METFORMINA EN UN MODELO
CELULAR DE HEPATOCARCINOMA

Por

EDGAR XCHEL FRANCO JUÁREZ

como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION
EN INMUNOBIOLOGIA

D i c i e m b r e , 2 0 2 0

**EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO VALPROICO Y
METFORMINA EN UN MODELO CELULAR DE HEPATOCARCINOMA.**

Vianey González V.

Dra. Vianey González Villasana
Presidente

[Signature]

Dra. Diana Resendez Pérez
Secretario

[Signature]

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

[Signature]

Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal

[Signature]

Dra. Claudia D. Altamirano Torres
Vocal

**EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO VALPROICO Y
METFORMINA EN UN MODELO CELULAR DE HEPATOCARCINOMA.**

Vianey González V.

Dra. Vianey González Villasana
Director

Mario

Dr. Mario A. Bermúdez de León
Co-director

El presente proyecto se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Vianey González Villasana, y en el Departamento de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Mario A. Bermúdez de León. El proyecto fue financiado por recursos obtenidos a través del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Insituto Mexicano del Seguro Social a través del Fondo de Investigación en Salud y el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, por los recursos económicos y tecnológicos otorgados para la realización de este trabajo. A la Universidad Autonoma de Nuevo León, a través de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Instituto de Inmunología y Virologia por la oportunidad para formarme como Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología y a la Unidad de Biología del Desarrollo perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por el espacio para desarrollar mis conocimientos.

Un especial agradecimiento hacia mis directores, la Dra. Vianey Gonzalez y el Dr. Mario Bermúdez, por todo su apoyo, guía, comprensión y paciencia, sin los cuales este trabajo y mi desarrollo no hubieran podido llevarse a cabo. Dr. Bermúdez, gracias infinitas por su confianza y una vez más gracias por haberme aceptado en su equipo de trabajo, vamos tan cerca del “sueño guajiro”, como nos sea posible Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, en especial al M.C. Alain Aguirre y la Dra. Katia Peñuelas a quienes les doy las gracias por su guía, por su tiempo y siempre disposición.

A mi madre, porque eres parte fundamental en lo que soy el día de hoy. Habré de continuar con tu ejemplo. A mi hermano, porque tu existir le dio un sentido de responsabilidad a mi vida. Habré de continuar para servirte de ejemplo. A mi abuelo, tu ejemplo, guía, voz, espíritu, cariño y confianza, me han dado pauta para ser un mejor hombre. Por ti, soy algo, ya solo me falta ser alguien. A mi tía Borita, por que tu cariño sin condición me dio algo importantísimo. Por ti, soy de aval. A ti Nanas, porque estas por decisión propia y haz brindado un apoyo de una medida inconmensurable, eres una parte fundamental en mi familia. Por tus consejos y cariño, habré de ser mejor persona. A mi familia, por todo el apoyo, platicas, ideas, consejos y las consideraciones que me proporcionaron, todo ha servido para cumplir con esta meta personal y poder contribuirles. Por ustedes y su ejemplo, he decidido continuar. Para todos ustedes, estoy.

A mi amigo Ricardo, tu sencilla, comprensiva y paciente compañía, tu voluntad y perseverancia han sido, como te lo he expresado en multiples ocasiones, un ejemplo de lo que uno debe de hacer para salir adelante aún y cuando las circunstancias son adversas. Amigo mío, para tí, estoy.

Una especial dedicatoria a mi querida tía Susa, estimado Tony, y amiga Lupita. Su prematura partida sigue siendo sentida por mí. Quizá, en algún punto del existir, nos volveremos a ver. Tengo fe. Por ustedes, tengo fuerza.

Índice

Índice de figuras	A
Lista de símbolos y abreviaturas	B
Resumen	D
Abstract	E
Introducción	1
Antecedentes	3
Bases del hepatocarcinoma celular.	3
Epidemiología del hepatocarcinoma celular.....	4
Tratamiento del hepatocarcinoma celular.....	4
Inhibidores de tirosinas cinasas	5
VEGF y VEGFR en hepatocarcinoma celular.....	7
Inhibidores de histonas desacetilasas.....	8
Histonas desacetilasas en hepatocarcinoma celular.....	9
Metformina.....	10
La vía mTOR en hepatocarcinoma celular.....	12
Farmacocinética de Sorafenib.....	13
Farmacocinética de Metformina.....	15
Farmacocinética del VPA.....	16
Reposicionamiento de fármacos.....	17
Hipótesis	20
Objetivos.....	21
Material y métodos	22
Resultados.....	28
Conclusión	48
Perspectivas	49
Literatura citada	50
Anexo 1. Esquema experimental de este estudio.	57
Anexo 2. Esquema de blancos moleculares de los fármacos Sor, VPA y Met.....	58
RESUMEN BIOGRAFICO.....	59

Índice de figuras

<i>Figura</i>	Título	Página
1	Mecanismo de acción de Sorafenib y otros inhibidores de tirosinas cinasas (TKi) sobre VEGFR y otras vías	6
2	Mecanismo de acción de los inhibidores de histonas desacetilasas	10
3	Mecanismo de acción de los inhibidores duales sobre los receptores mTOR	12
4	Farmacocinética en hepatocitos del Sorafenib	14
5	Farmacocinética de Metformina	15
6	Farmacocinética del VPA	17
7	Curvas dosis respuesta de los fármacos Sorafenib , VPA y Metformina en HepG2	25
8	Efecto de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina sobre la proliferación de la línea celular HepG2	27
9	Efecto de la combinación de Sorafenib, VPA y Metformina en la viabilidad de la línea celular HepG2	29
10	Determinación de efectos sinérgicos en la combinación triple de los fármacos.	30
11	Efecto de la combinación de Sorafenib, VPA y Metformina en la viabilidad de las líneas celulares Hepa1 y fibroblastos dérmicos humanos	31
12	Imágenes representativas del ensayo de lesión en células HepG2 expuestas al tratamiento farmacológico por 48 h	32
13	Efecto de una combinación de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina por 48 h en la migración de células HepG2	33
14	Imagen representativa de la integridad del RNA	34
15	Electroforesis representativa de la evaluación de la funcionalidad del cDNA	36
16	Expresión relativa del factor de crecimiento del endotelio vascular	37

Lista de símbolos y abreviaturas

° C	Grados centígrados
4EBP1	Proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E
4PL	Método de regresión no lineal de cuatro parámetros
Abs	Absorbancia
AMPK	Adenosin-monofosfato-cinasa
Asp	Ácido aspártico
ATP	Trifosfato de adenosina
AXL	Receptor tirosina cinasa AXL
BCRP-1	Transportador de la familia ABC
BIM	Proteína pro-apoptótica semejante a Bcl-2
cDNA	DNA complementario
CI	Índice de combinación
CO ₂	Dióxido de carbono
Cys	Cisteína
DMEM	Medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxinucleósido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGR-1	Proteína de respuesta a crecimiento temprano
eIF4E	Factor cuatro de alargamiento eucariótico
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
FDH	Fibroblastos dérmicos humanos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FLT3	Receptor tirocina cinasa 3 parecido a FMS
g	Unidades de gravedad
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GLOBOCAN	Observatorio global del cáncer
Glu	Ácido glutámico
h	Horas
HATS	Histonas acetilasas
HCC	Hepatocarcinoma celular
HDAC	Histonas desacetilasas
HDACi	Inhibidor de histonas desacetilasas
HGF-R	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1a	Factor inducible por hipoxia 1a
HR	Humedad relativa
IC ₅₀	Concentración inhibitora 50
KIT	Receptor tirosina cinasa KIT
Met	Metformina
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar

M-MLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney
MRP	Proteína asociada a multirresistencia a fármacos
mTOR	Blanco mecanístico del complejo de rapamicina
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OATP	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-R	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositidos-3-cinasa
PUMA	Proteína pro-apoptotica
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAF	Receptor serina/treonina cinasa
Raptor	Proteína reguladora asociada a mTOR
RET	Receptor tirosina cinasa RET
Rictor	Acompañante de mTOR independiente de rapamicina
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor tipo tirosina cinasa
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	RNA de interferencia pequeño
SIRT1	Sirtuina 1
Sor	Sorafenib
TIE	Tirosina cinasa parecida a inmunoglobulina y factor de crecimiento epidérmico
TKi	Inhibidor de tirosinas cinasas
UGT	UDP-glucuronil transferasa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-A	Isoforma A del factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar

Resumen

El hepatocarcinoma celular es el principal tipo de cáncer hepático. En México ocupa el noveno y tercer lugar en incidencia y mortalidad, respectivamente. La relación morbilidad/mortalidad es de 1:1. Los tratamientos actuales con quimioterapéuticos han logrado una extensión en la sobrevida de los pacientes de alrededor de tres meses. En los últimos años, diversos estudios han demostrado capacidades anti-cancerígenas en fármacos utilizados para el tratamiento de patologías diferentes al cáncer. Tal es el caso de los inhibidores de histonas desacetilasas y los análogos de rapamicina. Estudios de combinación de los inhibidores de histonas desacetilasas o análogos de rapamicina con quimioterapéuticos, han mostrado efectos sinérgicos en modelos *in vitro* relacionados a la inducción de apoptosis, inhibición de angiogénesis, proliferación y migración celular. Debido a la presencia de sinergismo en la combinación de los fármacos observado en neoplasias diferentes al hepatocarcinoma, este trabajo planteó la evaluación de la viabilidad, capacidad migrativa y potencial angiogénico por efecto de un tratamiento farmacológico combinado de Sorafenib, VPA y Metformina, en un modelo celular de hepatocarcinoma. La estrategia experimental consistió en la exposición de la línea celular HepG2 a diferentes concentraciones y combinaciones de Sorafenib, VPA y Metformina por 48 h. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante el reactivo Azul de Alamar. Se evaluó el efecto de la combinación de los fármacos en la capacidad migrativa mediante un ensayo de lesión. Se determinó el potencial angiogénico por efecto del tratamiento combinado por medio de qPCR dirigida a *VEGF-A*. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la viabilidad dependiente de la dosis en las células expuestas a los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina individualmente. La combinación de 2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM Metformina evidenció efectos sinérgicos en la disminución de la viabilidad celular. Las concentraciones previamente mencionadas mostraron una disminución en el porcentaje de cierre de lesión. El nivel de expresión de *VEGF-A* no mostró diferencias significativas comparado contra el grupo control. Como conclusión, el tratamiento farmacológico triple mostró efectos sinérgicos en la disminución de la viabilidad celular y en la capacidad migrativa, sin embargo, los niveles de *VEGF* permanecieron sin diferencias significativas con respecto al control.

Abstract

Hepatocellular carcinoma is the main type of hepatic cancer. In Mexico, it has the nine and third place in incidence and mortality, respectively, with a 1:1 morbidity/mortality relationship. Chemotherapeutic treatment extends the overall survival in three months approximately. Beside this, latest research with drugs used in diseases other than cancer, like the histone deacetylases inhibitors or rapalogues, have been described with *in vitro* anticancer properties and they have shown synergistic effects towards apoptosis induction and inhibition of angiogenesis, migration and proliferation in combination with approved chemotherapeutic drugs. For this reason, in this study we evaluated the viability, migration and angiogenic potential using a combination of Sorafenib, VPA and Metformina in hepatocellular carcinoma cells. Experimental design consisted in treatments of HepG2 cell line with different concentrations and combinations of Sorafenib, VPA and Metformin for 48 h to evaluate viability with Alamar Blue, migration with a wound healing assay, and angiogenic potential by qPCR with probes spanning on *VEGF-A* and *GAPDH* genes. As a result, treatment with Sorafenib, VPA or Metformin shown viability reduction in a dose-dependent fashion and the combination of 2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA and 10 mM Metformin showed strongest synergistic effect in the viability reduction. This last concentration also reduced migration but not angiogenic potential compared to control. In conclusion, combination of Sorafenib, VPA and Metformin has synergistic effects towards reduction of viability and migration potential, in contrast with angiogenic potential, where levels of *VEGF-A* remain with no differences compared to control.

Introducción

El hepatocarcinoma celular (HCC, por sus siglas en inglés) es el principal tipo de cáncer hepático. Los factores predisponentes son la hepatitis B y C, ingesta excesiva de alcohol, esteatosis no alcohólica e intoxicación por aflatoxinas (Savitha *et al.*, 2017). Dentro de todos los tipos de cáncer en México, el HCC ocupa el noveno y tercer lugar en incidencia y mortalidad, respectivamente, con una relación de incidencia masculino/femenino de 1:1 (GLOBOCAN, 2018).

Dentro de los tratamientos para el HCC se encuentran la ablación, resección, trasplante hepático, radioterapia, el tratamiento con el fármaco Sorafenib, un inhibidor de tirosinas cinasas (TKi) (Raza y Sood 2014) y el tratamiento sistémico. El Sorafenib es el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del HCC avanzado, cuyos efectos han demostrado una extensión de hasta 3 meses en la supervivencia de los pacientes (Cheng *et al.*, 2012).

Estudios previos con fármacos usados para tratamientos de patologías diferentes al cáncer, han demostrado diferentes efectos anticancerígenos. Tal es el caso del VPA, fármaco empleado como anticonvulsivo y estabilizador de ánimo (Komulainen *et al.*, 2015) debido a sus efectos como inhibidor de la vía GABA (ácido gama-amino-butírico) (Löscher *et al.*, 1981). El VPA ha sido descrito con el potencial para reducir la viabilidad (Zhu *et al.*, 2017), con un potencial antiangiogénico (Zhao *et al.*, 2016) y antiproliferativo (Sanaei y Kavosi, 2019; Wei *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015) en modelos *in vitro*.

La Metformina es un hipoglucemiante usado para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Gong *et al.*, 2012). Se han descrito efectos antiproliferativos (Li *et al.*, 2017) y de inducción de apoptosis (Tsai *et al.*, 2017) en modelos *in vitro* de HCC.

Los abordajes experimentales mediante la combinación de dos o más fármacos han sido una de las estrategias empleadas en el mejoramiento de las terapias convencionales. Se han observado que las ventajas de combinar moléculas farmacológicas son la

potenciación de los efectos del fármacos base, la posibilidad de reducir las dosis y por consecuencia, disminuir los efectos secundarios y el desarrollo de fármacoresistencia (García-Fuente *et al.*, 2018). Las interacciones farmacológicas pueden ser de potenciación, sumativas o antagónicas. En este sentido, la ecuación media del efecto cobra relevancia. Esta ecuación fue descrita por Chou (2006) y permite la obtención de un coeficiente denominado “Índice de Combinación” (CI). Mediante el valor obtenido en el CI es posible identificar efectos sinérgicos ($CI < 1$), sumativos ($CI = 1$) y antagónicos ($CI > 1$).

Estudios previos en células de HCC tratadas con la combinación de Sorafenib y VPA han descrito un posible efecto sinérgico en la inducción de apoptosis (Zhu *et al.*, 2017). La combinación de Sorafenib y Metformina también ha sido descrita con un potencial efecto sinérgico sobre la viabilidad (Chung *et al.*, 2018).

En la búsqueda y desarrollo de tratamientos farmacológicos, los modelos *in vitro* han mostrado ser una herramienta valiosa, tal es el caso de la línea celular HepG2, obtenida de un paciente caucásico diagnosticado con hepatocarcinoma, negativo a la integración del virus de hepatitis B, la cual exhibe una expresión de enzimas del citocromo P450 comparable con hepatocitos humanos y una mejor respuesta a la inducción de estas enzimas, comparado ante otras líneas de hepatocarcinoma como Huh-7 (Choi *et al.*, 2015).

Debido a la posibilidad de mejorar las terapias actuales y la tendencia al incremento del HCC, en el presente estudio se evaluó la viabilidad, capacidad migrativa y potencial angiogénico por efecto de la combinación de Sorafenib, VPA y Metformina en un modelo celular de hepatocarcinoma humano y murino. Además se evaluó el efecto de la combinación de los fármacos el efecto sobre la viabilidad celular en un modelo celular no canceroso.

Antecedentes

Bases del hepatocarcinoma celular.

El hepatocarcinoma (HCC) es el principal tipo de cáncer hepático. El desarrollo de HCC ha sido relacionado con diferentes factores de riesgo, entre los que destacan por su incidencia los factores bióticos, como las alteraciones genéticas provocadas por el virus de hepatitis B y C (Savitha *et al.*, 2017). Dentro de los factores abióticos destaca la ingesta de alcohol y el posterior desarrollo de cirrosis. La cirrosis es la antesala del 80% de los casos de hepatocarcinoma asociado con estos factores (Savitha *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016).

En el hepatocarcinoma causado por ingesta excesiva de alcohol se han descrito diferentes mecanismos moleculares involucrados, tales como la formación de acetaldehído, la inducción del complejo CYP450, reducción de antioxidantes, hipometilaciones, reducción del ácido retinoico, sobre carga de hierro, disminución de la respuesta inmune, inflamación y neoangiogenesis (Sidharthan y Kottilil, 2014).

La secuencia cronológica en la patogénesis del HCC indica en primer término la exposición crónica a los factores virales o toxigénicos. Posteriormente, en un lapso de diez a treinta y cinco años, ocurre el estadio denominado pre-neoplasia durante el que sucede el desarrollo de hepatitis crónica, cirrosis y la aparición de hepatocitos displásicos. Finalmente, se culmina con la formación del núcleo neoplásico denominado carcinoma hepatocelular (Thorgeirsson y Grisham, 2002). Cabe mencionar que a lo largo de la progresión anterior ocurren diferentes eventos moleculares en las células como la acumulación de mutaciones y aberraciones cromosomales (Ho *et al.*, 2016)

Estudios previos han encontrado modificaciones epigenéticas tales como diferencias en los patrones de metilación del DNA y diferencias en las marcas epigenéticas relacionadas a la metilación y acetilación de las histona. Las alteraciones epigenéticas en las histonas pueden causar un perfil de expresión aberrante relacionado con la expresión

de HDAC, mismas que se encuentran involucradas en el proceso de angiogénesis. El proceso de angiogénesis da lugar a la hipervascularización, un paso crítico en la progresión y mortalidad del cáncer hepático (Semela y Dufour, 2010). Además, estas modificaciones en la estructura de la cromatina provocan expresiones genéticas diferenciales que modifican procesos celulares como el ciclo celular, adhesión celular, proliferación celular y señalización de apoptosis (Ma *et al.*, 2014; Wahid *et al.*, 2017).

Epidemiología del hepatocarcinoma celular.

De acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer (2018), el total de casos nuevos en 2018 de cáncer reportados a nivel mundial fue de 18,078,957 con 9,555,027 de decesos. Durante el mismo año, el total de casos nuevos de cáncer hepático a nivel mundial fue de 841,080 mientras que los decesos reportados fueron de 781,631. Con base en las estadísticas anteriores, el cáncer hepático ocupa el sexto lugar mundial en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad. La relación masculino:femenino mundial es de 5:1.

El GLOBOCAN (2018) reportó para México que este tipo de cáncer está posicionado en el noveno lugar de incidencia con 7,265 casos nuevos, y es la tercera causa de muerte por cáncer con 6,868 casos. Se calcula que para el 2025, en nuestro país, existirá un incremento en la incidencia correspondiente a 9,387 casos anuales mientras que la mortalidad se ha proyectado a 8,935 decesos anuales. Aunado a lo anterior, la relación observada en México fue de 1:1 para ambos sexos. EL HCC tuvo mayor prevalencia en personas arriba de los 60 años de edad. Los principales factores predisponentes en México son los asociados con infecciones virales, alcoholismo y cirrosis criptogénica (Cisneros *et al.*, 2018; González *et al.*, 2014).

Tratamiento del hepatocarcinoma celular

El tratamiento actual del HCC depende de un criterio de elegibilidad quirúrgico en el paciente diagnosticado, el cual se determina según el estado de progresión del HCC de acuerdo con la clasificación según la Clínica del Hígado de Barcelona. Esta institución

toma en cuenta el número, tamaño y posición de los nódulos tumorales, además del índice Child-Pugh que determina la función hepática. Se estima que el 85% de los pacientes diagnosticados se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad, por lo que en la mayoría de los casos es necesario recurrir a otras alternativas de tratamiento como las opciones con quimioterapia, radioterapia o tratamientos paliativos.

Dentro de los tratamientos terapéuticos disponibles se encuentra el trasplante de hígado, ablación por radiofrecuencia, opciones de embolización, el tratamiento con Sorafenib y el tratamiento sistémico. Los pacientes tratados con opciones quirúrgicas han sido asociados con una tasa de sobrevivencia a cinco años de hasta el 75%. Por desgracia, menos del 20% de los pacientes pueden recibir estos tratamientos. Los pacientes tratados con terapias sistémicas han mostrado una sobrevivencia de aproximadamente tres meses más, comparado contra los pacientes que reciben tratamientos sintomáticos. La media de sobrevivencia de los pacientes con tratamiento sintomático oscila en menos de tres meses (Lin et al., 2012). Por lo anterior, se han buscado opciones terapéuticas con actividad concomitante hacia las opciones terapéuticas, principalmente al tratamiento con Sorafenib.

Inhibidores de tirosinas cinasas

Los receptores tirosina cinasas (RTK) son proteínas transmembranales que transfieren de manera selectiva, el fosfato γ obtenido desde un ATP hacia el grupo hidroxilo del aminoácido tirosina (Lemmon, 2010; Krause *et al*, 2005). La estructura general de estas proteínas está compuesto por un dominio extracelular para la interacción con el ligando, un dominio transmembranal y el dominio citoplásmico en el que se encuentra el sitio de actividad tirosina cinasa con una longitud de 60-70 aminoácidos (Shibuya, 2011). Esta familia de proteínas contiene a 20 subfamilias dentro de las cuales están contenidos los 3 receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular. La activación de estos receptores ocurre debido a la interacción con su ligando, el cual desencadena la dimerización de los monómeros y la posterior transducción de señales en una cascada que culmina en angiogénesis y migración celular (Shibuya, 2011).

El Sorafenib (Sor, Figura 1) es un inhibidor de tirocinas cinasas con efectos antiangiogénicos. Dentro de sus blancos moleculares se encuentran los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-R). El modo de interacción del fármaco con este receptor fue estudiado por Meng (2013) mediante acomplamiento molecular. Se determinó que la acción inhibitoria del fármaco ocurre por interacción con el sitio de unión de VEGF en los residuos Asp 1046, Cys 919 y Glu 885, por lo tanto se trata de una unión del tipo competitiva.

Chen y col. (2011) probaron los efectos de un modelo celular hepático tratado con Sorafenib y observaron efectos antiproliferativos y citotóxicos. Garten y col. (2019) demostraron los efectos apoptóticos debido a una disminución en la actividad de mTOR, indicador de una privación energética. Además, se consideró a la deacetilasa (SIRT1) como un probable blanco causal de la resistencia celular al tratamiento. De Mattia y col. (2019) esquematizaron los efectos del Sorafenib (Figura 1) sobre la vía Ras/RAF/MEK/ERK y demostraron que inhibe la fosforilación de MEK/ERK en una línea celular de adenocarcinoma.

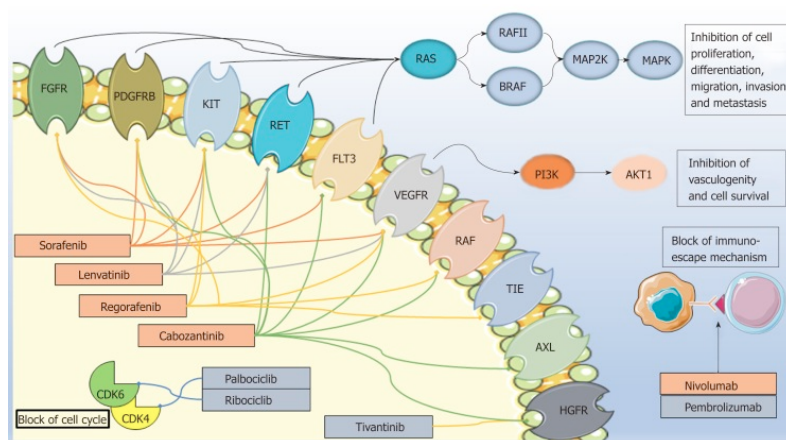


Figura 1. Mecanismo de acción de Sorafenib y otros inhibidores de tirosinas cinasas (TKi) sobre VEGFR y otras vías. Se muestran las rutas de activación de diferentes fármacos sobre los receptores y el efecto celular observado. Abreviaturas: FGFR (receptor del factor de crecimiento fibroblástico), PDGFRB (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), KIT (receptor tirosina cinasa KIT), RET (receptor tirosina cinasa RET), FLT3 (receptor tirocina cinasa 3 parecido a FMS), VEGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), RAF (receptor serina/treonina cinasa RAF), TIE (tirosina cinasa parecida a inmunoglobulina y EGF), AXL (receptor tirosina cinasa AXL), HGFR (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), RAS-RAF/BRAF-MAP2K-MAPK (cinasas pertenecientes a la vía MAPK

cinasas), PI3K-AKT1(proteínas pertenecientes a la vía fosfatidil-inositol 3 cinasas).Tomado de De Mattia y col. (2019).

VEGF y VEGFR en hepatocarcinoma celular

Dentro de los genes involucrados en el desarrollo del cáncer hepático se encuentra la familia del VEGF, que consta de aproximadamente 5 genes en humanos, mientras que la familia del receptor (VEGF-R) está compuesta por tres genes. Ambos elementos participan de forma primordial en el proceso angiogénico celular y tumoral. No obstante, no todas las isoformas de ambos elementos tienen la misma importancia cualitativa ni cuantitativa, pues la isoforma VEGF-A y sus receptores VEGF-R 1/2 son las principales involucradas en el proceso angiogénico tumoral (Shibuya, 2011).

Existen 4 subtipos de VEGF-A con base en su estructura, entre los cuales, la variante de 189 residuos se encuentra en la superficie celular y en la matriz extracelular. La interacción de VEGF-A con sus receptores, de acuerdo con el modelo de activación de Stuttfeld y Ballmer-Hofer (2009), provoca la homodimerización del dominio intracelular con actividad de cinasa y provoca la activación de una cascada de señalización que culmina en inducir permeabilidad celular, angiogénesis y la migración celular (Koch *et al.*, 2011; Morse *et al.*, 2019). Los receptores VEGFR-1/2, pertenecen a la familia de los receptores tirosina cinasa de clase 5, debido a la presencia en el dominio extracelular de siete regiones parecidas a dominios de inmunoglobulina.

El VEGFR-2 es el principal receptor en la superficie de las células endoteliales. La hipervascularización tumoral del HCC es una característica diferencial entre los tipos de cáncer humanos y común entre los tipos de hepatocarcinoma y se desarrolla debido a la hipoxia predominante en el microambiente tumoral (Lee *et al.*, 2016). Los vasos sanguíneos desarrollados presentan una morfología y función anormales que derivan en una administración deficiente de nutrientes y de oxígeno. Estas anomalías estructurales son causadas por una expresión aberrante de VEGF y la interacción con su receptor VEGF-R (Morse *et al.*, 2019).

El microambiente tumoral hipóxico es indeseable para la sobrevivencia de la célula neoplásica, pues el rápido desarrollo y división celular requieren de un aporte elevado de nutrientes y oxígeno para evitar la apoptosis y promover la sobrevivencia celular. La vía VEGF-VEGF-R es clave en el proceso angiogénico y forma parte del desarrollo y establecimiento de las condiciones requeridas para la progresión y sobrevivencia de las células tumorales con los correspondientes efectos transcripcionales en VEGF (Courtney *et al.*, 2015; Semela y Dufour, 2010). Actualmente, la búsqueda de nuevas estrategias incluye el uso de otros fármacos con sinergismo hacia Sorafenib, dentro de los cuales destacan los inhibidores de histonas desacetilasas (HDACi) como el VPA, el cual ha demostrado sus efectos antitumorales y antiangiogénicos en tratamientos *in vitro* (Kim *et al.*, 2001)

Inhibidores de histonas desacetilasas.

Los HDACi son moléculas capaces de inhibir la desacetilación de las histonas mediante el bloqueo del sitio activo de estas enzimas, lo que provoca modificaciones en el estado de la cromatina, y por consecuencia alterando la regulación de la expresión genética (Figura 2). Estas moléculas han adquirido importancia farmacológica y son considerados como potenciales fármacos en el tratamiento de distintos tipos de cáncer debido a los efectos observados *in vitro* e *in vivo*. Los efectos observados incluyen la inducción de apoptosis, disminución de la proliferación, efectos antiangiogénicos y arresto celular (Bolden *et al.*, 2006 Krämer *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001).

Los HDACi están clasificados en cuatro familias, en función de la histona desacetilasa que inhiban. Previamente los trabajos realizados por distintos grupos han demostrado que el VPA es un inhibidor de histonas desacetilasas de distintas clases cuya concentración óptima está ubicada entre 0.5 M y 2 M (Qian *et al.*, 2006; Krämer *et al.*, 2003).

Zhu y col. (2017) estudiaron los efectos de la administración del VPA de forma individual y en conjunto con Sorafenib en células HepG2. Determinaron un IC₅₀ de 6.0 μ M para Sorafenib y 5.3 mM para VPA. Además observaron sinergismo por efecto de la combinación de los fármacos en la inducción de apoptosis y reducción de la proliferación celular. Los autores atribuyen estos efectos a una supresión de las vías de señalización Notch3 y pAkt. Otros autores han demostrado efectos antitumorales en sinergia con el Sorafenib al combinarlo con otro HDACi como la tricostatina A (Chen *et al.*, 2019).

Histonas desacetilasas en hepatocarcinoma celular

Las HDAC humanas son un grupo de 18 enzimas clasificadas en cuatro clases que catalizan la remoción de grupos acilos funcionales desde los residuos de lisinas en proteínas histónicas y no histónicas a través de un mecanismo dependiente de zinc. Las clases de estas HDAC han sido establecidas en función de las similitudes en los residuos que presentan durante un alineamiento con las HDAC de las levaduras. La clase I, cuyas funciones no han sido claramente elucidadas, incluye a la HDAC 1, 2, 3 y 8, las cuales presentan homología con Rpd3 y pueden ser encontradas en núcleo, citoplasma y algunos organelos. La clase 2 presenta homología con Hda1 e incluye a las HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10; como característica diferencial, la HDAC 6 y 10 presentan un segundo dominio catalítico y se clasifican dentro del grupo II clase b. En el caso del grupo III, presentan un máximo de 50% de identidad con Sir2 y están localizadas en núcleo, mitocondria, citoplasma y nucléolo. Finalmente la clase IV, incluye a HDAC 11 y presenta homología con los dominios de la clase I y II (Seto y Yoshida, 2014 ; Mottamal *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2018)

En el caso de las HDAC histónicas (clase I y II), la remoción del grupo funcional acetilo resulta en la compactación de la cromatina, lo cual limita el acceso al DNA modificando los patrones de expresión genética (Seto y Yoshida., 2014 ; Most *et al.*, 2014). La ingesta de alcohol y el HCC han mostrado cambios a la baja en la expresión de las HDAC en conjunto con incrementos en la acetilación de histonas (Felisbino *et al.*, 2013; Most *et al.*, 2014). Estos cambios han sido correlacionados con la progresión del

HCC (Ler *et al.*, 2015), además de estar involucrados en patrones de expresión pro-angiogénicos y reducción en factores supresores de tumores (Kim *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios utilizando siRNA dirigidos hacia las HDAC 1 y 2 de forma individual y combinada, y los resultados han demostrado una disminución en la proliferación celular e inducción de apoptosis (Ler *et al.*, 2015). Fan y col. (2014) estudiaron el efecto del silenciamiento de la HDAC 5 en un modelo *in vivo* e *in vitro*, demostrando una disminución en la proliferación del HCC, un incremento en la actividad transcripcional de p53 y acumulación de dicho factor en el núcleo. Finalmente, otros estudios dirigidos hacia la inhibición de otras clases de HDAC han mostrado efectos antiproliferativos, inducción de apoptosis e inclusive actividad antiangiogénica (Liu *et al.*, 2018).

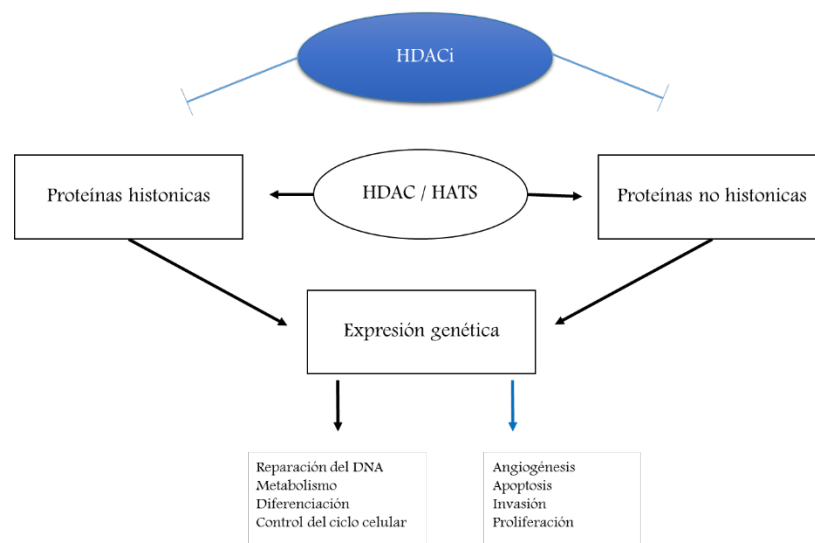


Figura 2. Mecanismo de acción de los inhibidores de desacetilasas de histonas. Abreviaturas: HDAC (histonas desacetilasas), HDACi (inhibidores de histonas desacetilasas), HATS (histonas acetilasas). Modificado de Suraweera (2016).

Metformina

El fármaco Met es una biguanida conocido como N-N-dimetil-biguanida, pertenece a las moléculas denominadas rapálogos, y es derivado de la planta *Galega officinalis*. Met es utilizada principalmente para el tratamiento de diabetes tipo 2, debido a su capacidad para disminuir los niveles de lípidos en sangre y suprimir a la

gluconeogenesis hepática. La Met también incrementa la respuesta a la insulina por parte del musculo esquelético (Aliper *et al.*, 2017 ; Ong *et al.*, 2016).

El modo de acción de la Met aún es motivo de estudios (Figura 3), dado los efectos pleiotrópicos observados (Ong *et al.*, 2016). Se ha observado un menor riesgo de desarrollo de HCC en pacientes que toman este fármaco (Chen *et al.*, 2013). Actualmente, se conoce que la Met presenta sus efectos principalmente debido a la activación de la adenosin-monofosfato-cinasa (AMPK), que a su vez es capaz de bloquear a mTOR. El receptor mTOR es capaz de inactivar a el factor inducible por hipoxia (HIF-1a) y al factor de elongación eucariótico 4E (eIF4E). En un modelo propuesto por Fruman en el 2016 (Figura 2), se observa que la disrupción de eIF4E resulta en una inhibición del oncogen c-MYC y a un incremento en la proteína proapoptótica PUMA. Met también tiene la capacidad de inhibir al mTORC2 y por consecuencia incrementar la presencia de la proteína de respuesta a crecimiento temprano (EGR1), un factor transcripcional que promueve la expresión de la proteína proapoptótica semejante a Bcl2 (BIM). Wei y col (2018) estudiaron los efectos de un tratamiento de Met combinado con VPA en dos líneas celulares de cáncer renal. En este estudio determinaron un IC₅₀ para Met de 20.57 mM y 2.42 mM de VPA, respectivamente. Además, se ha encontrado efectos sinérgicos con Met y VPA en la reducción de la migración e inducción de apoptosis. Los efectos sinérgicos de estos fármacos también ha sido observados en líneas celulares de cáncer prostático *in vitro* e *in vivo* (Tran *et al.*, 2019). Inclusive, en líneas hepáticas como HepG2 (Li *et al.*, 2017) y en líneas celulares xenográficas derivadas de pacientes expuestas a Sorafenib [0, 10, 20, 30 mM], Metformina [0, 5, 10 mM] y combinaciones de los fármacos, se han observado efectos sinérgicos disminuyendo la viabilidad celular e inducción de autofagia, pero no se observaron efectos citotóxicos (Chung *et al.*, 2018)

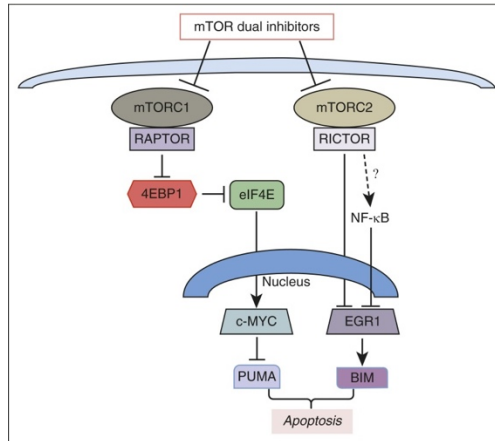


Figura 3. Mecanismo de acción de los inhibidores duales sobre los receptores mTOR. Se muestra el efecto de los inhibidores sobre los receptores y la cascada de señalización que conlleva a la apoptosis. Abreviaturas: mTORC1/mTORC2 (receptor diana en mamíferos para rapamicina), RAPTOR (proteína reguladora asociada a mTOR), RICTOR (acompañante de mTOR independiente a rapamicina), 4EBP1 (proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de traducción 4E), eIF4E (factor de inicio de la traducción eucariótico 4E), c-MYC (oncogen MYC), PUMA (proteína moduladora de la apoptosis), EGR1 (proteína 1 de respuesta a crecimiento temprano), BIM (proteína proapoptótica semejante a Bcl2). Tomado de Fruman (2016).

La vía mTOR en hepatocarcinoma celular

La vía mTOR se encuentra activada en HCC por una variedad de factores tales como la hipoxia, la vía RAS/RAF/MERK/ERK y el déficit de energía producto del metabolismo acelerado (Matter *et al.*, 2014). El blanco de rapamicina en mamíferos es una cinasa citoplasmática del tipo serina/treonina denominada mTOR, con un peso de 289 kDa (Ong *et al.*, 2016). El receptor mTOR pertenece a la familia de cinasas relacionadas con fosfoinositidos-3- cinasa (PI3K) y exhibe dos complejos multiproteicos denominados mTORC1 y mTORC2. El receptor mTOR participa en procesos como el crecimiento, metabolismo y migración celular. En condiciones cancerosas, mTOR se encuentra sobre-expresado, y en HCC ha sido asociado con un mal diagnóstico y recurrencia temprana en pacientes sometidos a trasplante de hígado (Matter *et al.*, 2014).

En cuanto a los complejos mTORC1 y 2, ya se conocen las proteínas que los conforman e inclusive algunas funciones de éstas; otras permanecen pendientes por elucidarse. Referente a las funciones de estos complejos, mTORC1 es considerado un

regulador primordial del metabolismo, pues limita procesos catabólicos como la autofagia, el cual es un proceso proveedor de energía a través de la destrucción de constituyentes celulares (Kaur y Debnath, 2015). Por otro lado, mTORC1 es capaz de regular el metabolismo anabólico induciendo la síntesis de distintas biomoléculas como proteínas y lípidos, inclusive participa de la biosíntesis de organelos celulares. En cuanto a mTORC2, poco es conocido sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la organización del citoesqueleto y sobrevivencia celular. Laplante y Sabatini (2014) suman algunos de los resultados obtenidos por otros autores, en los cuales fue identificado que el bloqueo de mTORC2 promueve la expresión de genes asociados con la respuesta al estrés, genes de arresto celular y apoptosis debido a la activación de la proteína FoxO1.

El uso de fármacos inhibidores de mTORC ha sido investigado por varios autores en diferentes tipos de cáncer (Cifarelli *et al.*, 2015 ; Soliman, Steenson y Etekp, 2016; Adnane *et al.*, 2006). La relevancia clínica de Met se debe a la baja prevalencia de cáncer hepático observada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, la cual *per se* involucra un riesgo elevado de desarrollo de HCC. Met ha demostrado su efecto antiproliferativo y la inducción de arresto celular sobre hepatocitos *in vitro* expuestos al tratamiento (Chen *et al.*, 2013) con el inhibidor de mTOR (Matter *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2013 ; Cifarelli *et al.*, 2015). Recientemente, Ling y col. (2017) expusieron a las líneas celulares de hepatocarcinoma HepG2 y Bel-7402 a un tratamiento con Sorafenib y Metformina, demostrando sinergismo en efectos antiproliferativos *in vitro* e inhibición del desarrollo tumoral *in vivo*, causados por la actuación de ambos fármacos sobre los complejos mTORC1 y mTORC2.

Farmacocinética de Sorafenib

Sorafenib es una molécula pequeña y con características lipídicas. Sorafenib se administra de forma oral y alcanza a los hepatocitos a través de la vena portal. El ingreso de Sorafenib a las células es llevado a cabo mediante transportadores aniónicos y

cati3nicos, y posteriormente es metabolizado por enzimas de fase I y fase II (De Mattia *et al.*, 2019).

Se han identificados 8 metabolitos del f3rmaco (Figura 4), denominados de M1 hasta M8; la forma M2 (N-oxido-piridina) es producida mediante oxidaci3n por el CYP3A4 y es el principal metabolito en plasma, adem3s de ser precursor del glucur3nido de N-oxido-piridina (M8) y N-hidroximetil-N-oxido-piridina (M1). La enzima de fase II responsable de la glucuronidaci3n es UGT1A9 y participa en la conjugaci3n de Sorafenib hacia la forma M7 o glucur3nido de Sorafenib. Dentro de estos metabolitos, las formas M2, M4 y M5 son los que cuentan con la capacidad de inhibir a VEGF-R, MEK y ERK (Gong *et al.*, 2017). Despu3s de conjugarse, las formas M7 y M2 son excretadas hacia los tubos biliares para ser evacuadas principalmente por las heces y la orina. Cabe destacar que el 56% del f3rmaco es eliminado sin cambios.

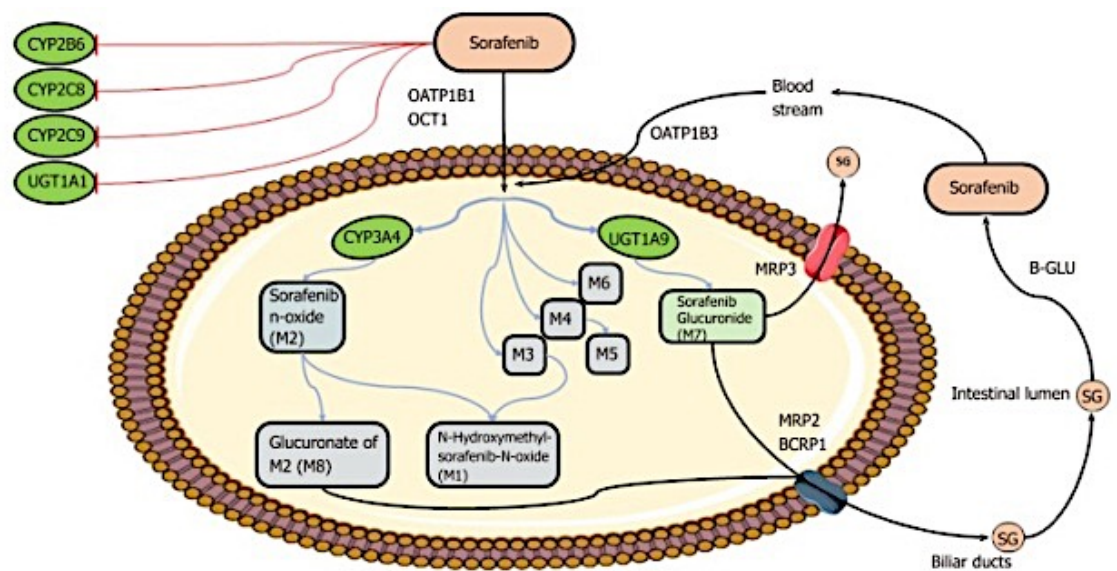


Figura 4. Farmacocin3tica en hepatocitos del Sorafenib. Se muestra el metabolismo de Sorafenib en c3lulas hep3ticas y las enzimas que participan en la generaci3n de los metabolitos y los transportadores que facilitan su absorci3n y excreci3n. Abreviaturas: CYP (prote3nas del citocromo P450), M1:M8 (metabolitos del Sorafenib), OATP (polipeptido transportador de aniones org3nicos), MRP (prote3na asociada a multirresistencia de f3rmacos), BCRP1 (transportador de la familia ABC), UGT (glucuronosil transferasas dependientes de uracil-difosfato). Tomado de De Mattia (2019).

Farmacocinética de Metformina

La Metformina no experimenta cambios durante el tránsito en el cuerpo humano (Figura 5). Su absorción ocurre debido a la difusión activa por transportadores catiónicos ubicados en la membrana celular de los enterocitos intestinales, hepatocitos y células epiteliales renales (Gong *et al.*, 2012)

Los transportadores principales para Metformina en los hepatocitos son OCT1/SLC22A1 y OCT3/SLC22A3, ubicados en la membrana basolateral de estas células (Figura 5). Metformina es excretada principalmente por vía renal (Gong *et al.*, 2012)

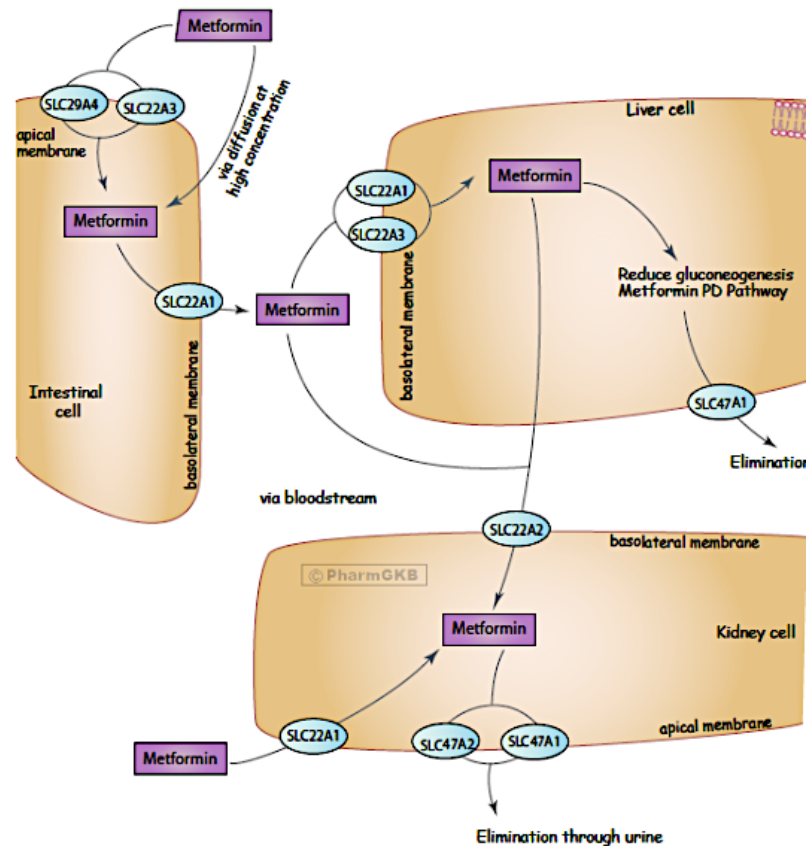


Figura 5. Farmacocinética de Metformina. Se muestran los transportadores involucrados en la absorción y excreción de Metformina. Abreviaturas: SLC2 (acarreador de solutos perteneciente a la familia 2). Tomado de Gong y col. (2012)

Farmacocinética del VPA

El VPA es metabolizado mediante 3 rutas en los seres humanos (Figura 6) y exhibe efectos en la síntesis del ácido gama aminobutírico (GABA) en células neuronales, además de interferir en el movimiento de iones al perturbar canales iónicos. Recientemente, se ha demostrado que VPA tiene propiedades como HDACi (Felisbino *et al.*, 2013).

Las vías de metabolización son la glucuronidación, con una participación del 50% y genera glucuronido de valproato como metabolito. La beta-oxidación ocurre hasta en un 40% de VPA y es responsable de la formación de metabolitos tóxicos como el 2,4,diene-VPA-CoA. Finalmente, la oxidación mediada por enzimas del citocromo P450 son responsables del 10% de la metabolización de este fármaco y generan metabolitos con hepatotoxicidad como el 4-ene-VPA y formas inactivas como el 3-OH-VPA o el 4-OH-VPA (Gopaul, Farrell, y Abbott, 2003).

La forma nativa del VPA es la forma activa para inhibir las histonas desacetilasas (Ghodke *et al.*, 2013)

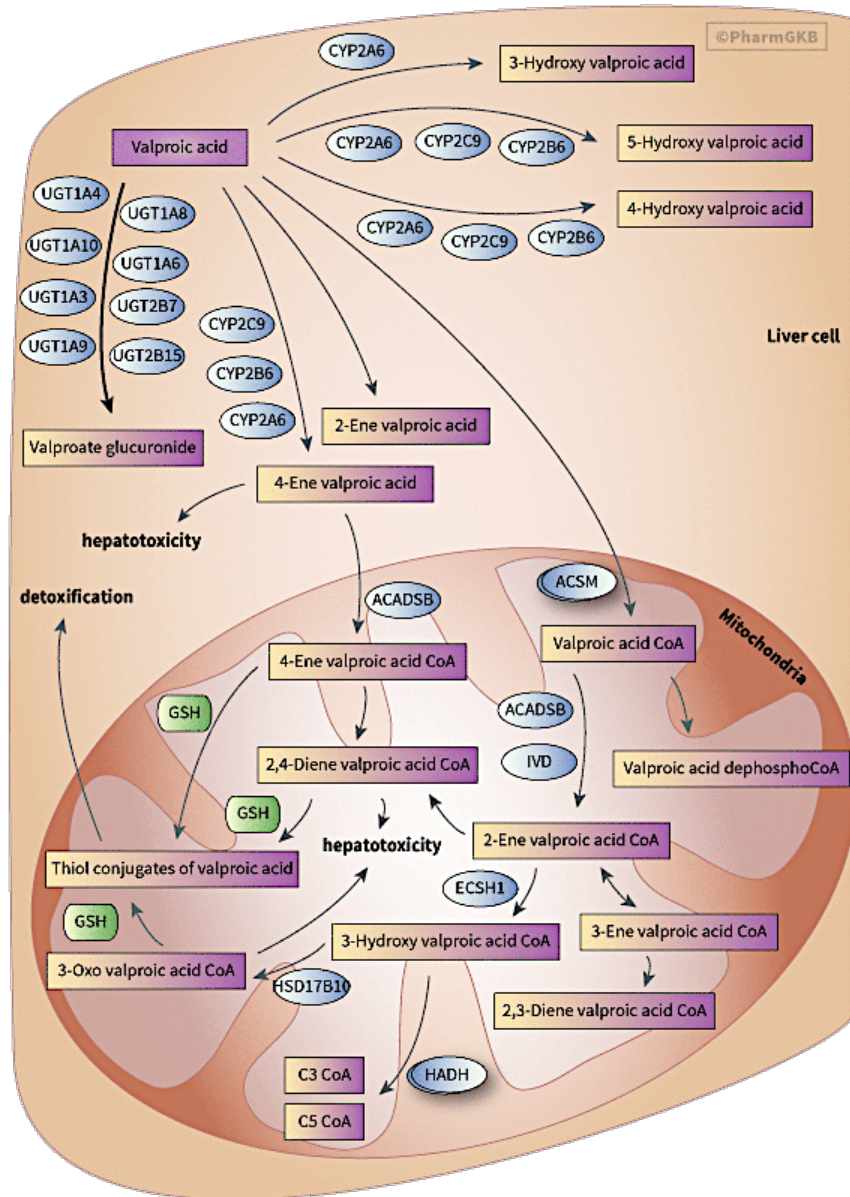


Figura 6. Farmacocinética del VPA. Se muestran las enzimas que participan en el metabolismo de VPA en una célula hepática. Abreviaturas: CYP (proteínas del citocromo P450), ACADSB (acil-coenzima-A deshidrogenasa de cadena corta), IVD (isovaleril-coenzima-A deshidrogenasa), ACSM (acil-coenzima-A sintetasa), ECHS1 (enoyl-coenzima-A hidratasa), HADH (hidroxi-acil-coenzima-A deshidrogenasa), GSH (glutathion) Tomado de Ghodke y col. (2013)

Reposicionamiento de fármacos

El desarrollo tradicional de los fármacos involucra un proceso de descubrimiento, adecuación y pruebas en distintos modelos que usualmente toma hasta 13.5 años y con un costo oscilando los 1800 millones de dolares y con un riesgo muy elevado de fracaso en

la última fase de pruebas. En este sentido, el reposicionamiento de fármacos cobra relevancia debido a diversas ventajas, entre las cuales se destacan los perfiles de seguridad del fármaco en cuestión previamente descritos y aprobados, además de un costo de desarrollo menor debido a la descripción previa de sus efectos en modelos preclínicos (Pushpakom *et al.*, 2019).

El estudio en modelos pre-clínicos de un fármaco con propósitos diferentes a los inicialmente aprobados, ha permitido encontrar efectos potencialmente favorables debido a la descripción de nuevos mecanismos de interés de acuerdo con la patología estudiada. Lo anterior se traduce en el uso de un fármaco en una enfermedad distinta a la originalmente aprobada (Sleire *et al.*, 2017). Diversos son los fármacos que se han reposicionado exitosamente; así también los abordajes realizados para tal finalidad (Pushpakom *et al.*, 2019). Cha y col. (2018) resumieron los abordajes actualmente utilizados en el reposicionamiento de fármacos y pueden ser clasificados en abordajes experimentales y abordajes *in silico*. En el primero se encuentra el abordaje molecular, el cual consiste en la conceptualización de los blancos moleculares de un fármaco y la relación de estos con una patología específica. En este sentido, este abordaje hace uso de herramientas y estudios asociados a genómica, transcriptómica y proteómica para establecer las posibles asociaciones fármaco/patología (Cha *et al.*, 2018).

Justificación

El hepatocarcinoma (HCC) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial, y en México ocupa el sexto lugar en causas de muerte y el octavo en incidencias. Las estadísticas permiten predecir una tendencia al alza de casos de HCC para los próximos años. Actualmente, los tratamientos contra el HCC incluyen cirugías de ablación y trasplante, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, el pronóstico de los pacientes no es favorable, pues hasta hoy la relación de morbilidad:mortalidad es 1:1, lo cual hace evidente la necesidad de buscar alternativas viables para el tratamiento de esta malignidad. Los inhibidores de histonas desacetilasas y la Metformina, han mostrado efectos sinérgicos con el Sorafenib en modelos *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, se considera de interés la evaluación de un tratamiento combinado del Sorafenib, con el VPA y Metformina, para la observación de los efectos en la viabilidad, capacidad migrativa y potencial angiogénico en un modelo celular de hepatocarcinoma.

Hipótesis

La combinación de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina disminuye la viabilidad, la capacidad migrativa y angiogénica de un modelo celular hepático.

Objetivos

General

- ⇒ Evaluar un tratamiento farmacológico combinado sobre la viabilidad, capacidad migrativa y angiogénica en un modelo de hepatocarcinoma celular

Particulares

- ⇒ Determinar la viabilidad de la línea celular HepG2 expuesta a un tratamiento farmacológico combinado.
- ⇒ Determinar la capacidad de migración celular por efecto del tratamiento farmacológico combinado.
- ⇒ Evaluar el efecto en el potencial angiogénico a través de la expresión genética del gen *VEGF* por el tratamiento farmacológico combinado.

Material y métodos

Línea celular

Las líneas celulares HepG2, Hepa1 y fibroblastos dérmicos humanos (FDH) fueron cultivados en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Minimal Essential Medium) alta glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio. Las células fueron incubadas a 37°C, 5 % CO₂ y 100% de humedad relativa (HR). Los pases celulares se realizaron al 80% de confluencia.

Reactivos

El medio de cultivo Gibco DMEM 1× (lote 2122728) fue adquirido en Life Technologies (Grand Island, NY, USA). La solución 100× HyClone MEM Non-Essential Amino Acids (lote AC10250490) fue adquirida en GE Healthcare Life Sciences (South Logan UT, USA). La solución 100 mM Sodium Piruvate (lote 28918006) fue adquirida en Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA). La solución Trypan Blue Staining 0.4% (lote 1914469) fue adquirida en Invitrogen (Eugene, OR, USA). El ácido valproico (lote MKBS5723V) y el dimetil-sulfoxido (lote SHBJ5443) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). La Metformina (lote 0544112-23) y Sorafenib (lote 100009644) fueron adquiridos en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Ensayo de viabilidad

Para la determinación de la curva dosis-respuesta, se sembraron $\sim 8 \times 10^3$ células HepG2 por pozo en una placa de 96 pozos y fueron incubadas durante 48 h. Posteriormente fueron expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de los fármacos (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M Sorafenib, 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 VPA, y 0, 6.25, 12.5, 18.75, 25, 31.25, 37.50, 43.75 y 50 mM Metformina). El grupo control consistió en células expuestas durante 48 h a DMEM completo y el tratamiento con el vehículo consistió en

células expuestas a DMEM completo y 0.1% de DMSO (dimetil-sulfóxido). Después de la incubación, se descartó el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1×. Seguidamente las células se incubaron por 3 h, con el reactivo resazurina. Posteriormente se realizó la lectura a 570 y 590 nm en el lector de placas 800 TS (BioTek, Winooski, VT, E.U.). La estimación del IC₅₀ se realizó mediante una regresión no lineal de cuatro parámetros (4PL).

La determinación de la viabilidad por efecto de la combinación de los fármacos, se llevó a cabo mediante la evaluación de diferentes tratamientos (1, 2, 3 y 4 µM Sorafenib, 2, 4, 6 y 8 mM VPA, y 5, 10, 15 y 20 mM Metformina) administrados de forma individual, en combinaciones duales y combinaciones triples durante 48 h. Los grupos control y vehículo constaron de DMEM completo y DMEM completo adicionado con 0.1% DMSO, respectivamente. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1× y luego incubadas con rezasurina por 3 h. Las lecturas se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita más arriba.

Para el caso de las líneas celulares Hepa1 y fibroblastos dérmicos humanos (FDH), se sembraron $\sim 4 \times 10^3$ células Hepa-1 por pozo y $\sim 3 \times 10^3$ células por pozo de FDH, ambos en placas de 96 pozos y fueron incubadas por 48 h antes de iniciar los tratamientos. Posteriormente, las células fueron expuestas a diferentes tratamientos (2 µM Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM Metformina) de forma individual, combinación dual y en combinación triple durante 48 h. La constitución de los grupos control y vehículo fue la misma descrita anteriormente. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1× e incubadas con rezasurina por 2 h. Las lecturas de viabilidad se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita en los párrafos anteriores.

Ensayo de proliferación

Se sembraron $\sim 8 \times 10^3$ células HepG2 por pozo en placas de 96 pozos e incubaron durante 48 h. Posteriormente, se iniciaron tratamientos con los fármacos hasta por 96 h, evaluando diferentes concentraciones (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 µM Sorafenib, 0, 2.5, 5, 7.5, 10,

12.5, 15, 17.5 y 20 VPA, y 0, 6.25, 12.5, 18.75, 25, 31.25, 37.50, 43.75 y 50 mM Metformina) y los grupos control y vehículo fueron conformados de acuerdo a lo descrito previamente. Al término, se realizaron dos lavados con PBS 1× y se realizó una incubación por 3 h con rezarsurina en las mismas condiciones descritas en párrafos previamente. Las lecturas fueron realizadas mediante la metodología descrita más arriba.

Ensayo de migración

Para los ensayos de migración, se sembraron 8×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos e incubadas por 48 h en medio de cultivo. Posteriormente, se iniciaron los tratamientos al realizar un cambio de medio precedido de un lavado con PBS 1× y adicionar a los grupos tratamiento diferentes concentraciones de SFB (0%, 5% y 10%) e incubar las células por 24 h. Para eliminar el fondo causado por la proliferación, el grupo suplementado con 10% de SFB fue incubado durante 2 h con DMEM fresco complementado con mitomicina C (10 µg/mL) para seguidamente realizar la lesión en todos los grupos experimentales con una punta de 200 µL. Se realizaron lavados con PBS 1× para retirar los detritos celulares y a continuación se administró el tratamiento farmacológico (2 µM Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM Metformina) durante 48 h y se tomaron imágenes en lapsos de 24 h. Las imágenes fueron procesadas mediante el programa ImageJ en conjunto con la herramienta Wound Healing Assay Size Tool (Suarez-Arnedo *et al.*, 2020) El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h durante los tratamientos.

Tratamiento con Sorafenib

Se preparó un stock 10 mM de Sorafenib (Sor) solubilizado en DMSO, el cual fue alicuotado y permaneció a -20 °C hasta su uso. Posteriormente, el stock de trabajo de 100 µM, se preparó al diluir una alícuota en DMEM y a partir de este se prepararon los tratamientos diluyendo el stock de trabajo en DMEM nuevamente. El volumen máximo de DMSO usado en el cultivo fue de 0.1%.

Tratamiento con VPA

Se preparó un stock 200 mM al disolver VPA en agua desionizada estéril. A partir de este stock, se preparó un stock de trabajo a 50 mM al diluir con DMEM. Las soluciones fueron preparadas y administradas en fresco.

Tratamiento con Metformina

Se preparó un stock 500 mM al mezclar Metformina (Met) en agua desionizada estéril. El stock de trabajo se preparó a una concentración de 125 mM al disolver la solución anterior en DMEM. Las soluciones fueron preparadas y administradas en fresco.

Extracción de RNA

Se realizó la extracción con el reactivo RNAzol® RT (MRC, Cincinnati, OH, E.U.) de acuerdo al protocolo del proveedor. Brevemente, la lisis celular se realizó al añadir 1 mL de RNAzol® RT en cada pozo y se incubó la reacción por 10 min a 4 °C. Para la precipitación del DNA, proteínas y polisacáridos, el lisado celular fue recuperado y se añadió 0.4 mL de agua desionizada estéril y se agitó vigorosamente. La reacción se incubó por 10 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante fue centrifugada (12,000 g por 15 min) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Para precipitar el RNA, se mezclaron 800 µL del sobrenadante con 800 µL de isopropanol y se incubó la reacción durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó (12,000 g por 10 min). El lavado del RNA se realizó al descartar el sobrenadante y añadir 1 mL de etanol al 75% y la mezcla se centrifugó (7500 g por 5 min) y el sobrenadante fue descartado. La pastilla fue solubilizada al añadir agua libre de nucleasas y se incubó en un termobloque a 65 °C por 15 min. Posteriormente, se evaluó la integridad del RNA mediante una separación electroforética en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, E.U.) en un transiluminador con luz UV. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Cuantificación y evaluación de funcionalidad del RNA

Se realizó la cuantificación del RNA mediante espectrofotometría a 260 nm, y la pureza se determinó por la relación de absorbancia de los valores de 260 sobre 280 nm, y de 260 sobre 230nm en el equipo NanoDrop TM 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.).

Para evaluar la funcionalidad del RNA extraído, se sintetizó cDNA con la enzima retrotranscriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.) mediante el protocolo del proveedor en un volumen final de 20 µL. La mezcla 1 se preparó al añadir 1 µL de dNTP's (10 mM), 1 µL hexámeros aleatorios (50 ng/ µL), 1 ng de RNA y 9 µL de agua libre de nucleasas. La mezcla 2 constó de 2 µL de DTT (0.1 M), 1 µL de RNasa Out (40 U/µL) (Invitrogen), 4 µL de First Strand Buffer (5×) (Invitrogen).

La mezcla de reacción 1 fue incubada por 5 min a 65 °C, y después en hielo para añadirse la mezcla de reacción 2, y se incubó por 2 min a 37 °C. Al término, se agregó 1 µL de enzima M-MLV e incubó durante 10 min a 25 °C y 50 min a 37 °C. Al término, la reacción fue inactivada por 15 min a 70 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente se realizó una reacción de PCR en un volumen final de 20 µL y el cDNA sintetizado en el paso anterior fue utilizado como templado de amplificación con primers dirigidos hacia el gen 18S ribosomal. Los parámetros usados fueron: 30 ciclos compuestos de las fases de desnaturalización a 95 °C por 5 min, fase de alineamiento a 55 °C por 1 min, fase de extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

La reacción de qPCR se llevó a cabo en condiciones standard. Se utilizó una mezcla maestra compuesta de sondas TaqMan® dirigidas hacia *VEGF-A*, cDNA y agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 µL. Como control endógeno se utilizó al gen

GAPDH (Gliceraldeído-3-fostado-deshidrogenasa). El análisis de los datos se llevó a cabo de acuerdo con Livak y Schmittgen (2001) mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

Para los análisis proliferación se utilizó la prueba ANOVA de dos vías acoplado a la prueba de comparación múltiple de Dunnett. El análisis para las pruebas de viabilidad por efecto de la combinación de Sorafenib, VPA y Metformina fue un ANOVA de una vía acoplado a prueba de comparación múltiple de Tukey. Para la determinación del nivel de expresión de *VEGF* por qPCR se utilizó prueba U-Mann-Whitney. En la prueba de migración por ensayo de lesión, se utilizó la prueba t-student para muestras pareadas. Todas las pruebas anteriores se utilizaron con un alfa mínimo de 0.05 y máximo de 0.01.

Resultados

Determinación de IC_{50} en la línea celular HepG2 por efecto de Sorafenib, VPA y Metformina.

Se determinó la IC_{50} en la línea celular HepG2 mediante un ensayo de viabilidad con el reactivo resazurina. Las células se incubaron por 48 h con diferentes concentraciones de los fármacos (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M Sorafenib, 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 mM VPA; 6.25, 12.5, 18.75, 25, 31.25, 37.50, 43.75 y 50 mM Metformina) en las mismas condiciones descritas anteriormente, se elaboraron curvas dosis-respuesta (Figura 7) y se analizaron mediante el análisis de regresión no lineal de 4 parámetros (4PL). Se observó una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis en los tres fármacos y el IC_{50} obtenido fue de 5.987 μ M, 12.29 mM y 23.37 mM para Sorafenib, VPA y Metformina, respectivamente.

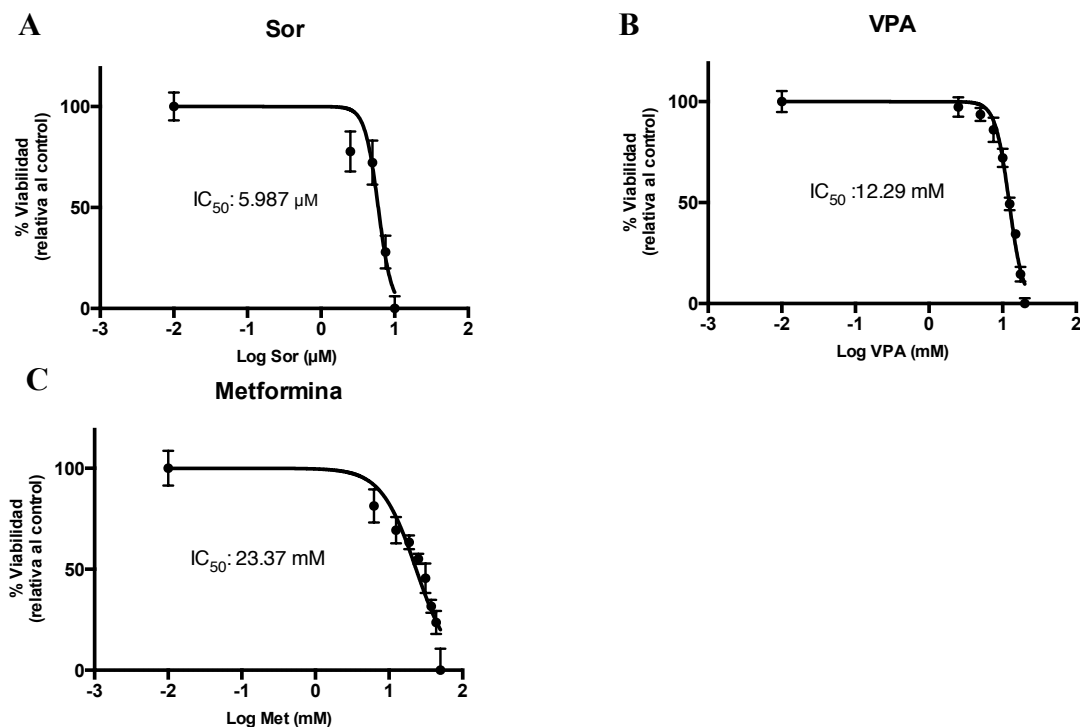


Figura 7. Curvas dosis respuesta de los fármacos Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) en células HepG2. Las células fueron expuestas por 48 h a diferentes concentraciones de Sorafenib, VPA y Metformina. Posteriormente la viabilidad fue evaluada mediante la reducción del reactivo resazurina. Los resultados fueron analizados mediante el método 4PL y se determinó la IC_{50} para A) Sorafenib (5.987 μ M, B) VPA (12.29 mM) y C) Metformina (23.37 mM). Los valores corresponden a tres ensayos independientes y las barras representan la desviación estándar.

Evaluación de la proliferación celular por efecto de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina.

Con el objetivo de determinar si los fármacos tenían un efecto sobre la proliferación de la línea celular HepG2, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de los fármacos (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M Sorafenib 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 mM VPA; 6.25, 12.5, 18.75, 25, 31.25, 37.50, 43.75 y 50 mM Metformina) hasta por 96 h (Figura 8). Al término del periodo de incubación, las células se incubaron por 3 h con el reactivo resazurina y se midió la proliferación celular. Se observó que los tres fármacos tienen la capacidad de reducir la proliferación y el efecto es dependiente del tiempo y de la dosis.

El tratamiento con Sorafenib (Figura 8A) demostró que las concentraciones de 7.5 y 10 μ M a partir de 48 h y hasta 96 h disminuyeron de forma significativa ($p = 0.05$) la proliferación celular. Las concentraciones de 2.5 y 5 μ M mostraron una disminución en la proliferación durante las 96 h evaluadas. Las células expuestas a VPA (Figura 8B) mostraron una disminución en la proliferación celular significativa ($p = 0.05$) en todos los tratamientos comparados contra el control. El efecto fue más evidente a partir del tratamiento con 12.5 mM y se observó que la proliferación disminuyó en forma dosis dependiente, inclusive alcanzó el 100% de mortalidad en el tratamiento con 20 mM en las primeras 48 h, mientras que el tratamiento con 17.5 mM alcanzó el mismo porcentaje de mortalidad hasta 72 h. Además, a partir de 72 h el resto de las concentraciones mostró un incremento en la proliferación con excepción del tratamiento con 7.5 mM, no obstante la diferencia fue altamente significativa al comparar este tratamiento contra el control.

El tratamiento con Metformina (Figura 8C) disminuyó de forma significativa ($p = 0.05$) la proliferación celular y el efecto fue más evidente a partir de 48 h, con excepción del tratamiento con 6.25 mM, el cual mostró que la cantidad de células permaneció constante. El resto de los tratamientos mostraron que la disminución de la proliferación

fue dependiente de la dosis y además la tendencia del efecto se prolongó hasta 96 h.

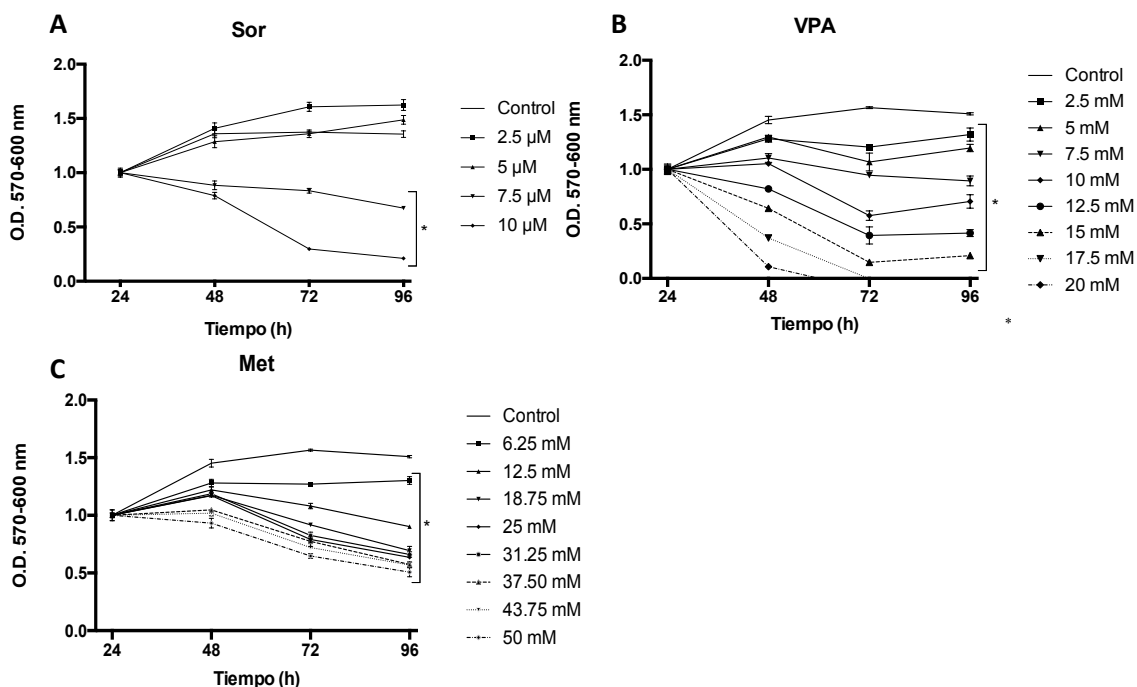


Figura 8. Efecto de los fármacos Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) sobre la proliferación de la línea celular HepG2. La línea celular HepG2 fue incubada hasta por 96 h con diferentes concentraciones de los fármacos. Los controles corresponden a células incubadas con el vehículo DMSO para el caso de Sorafenib o células incubadas sin tratamiento. Las células fueron expuestas a Sorafenib (A) en concentraciones de 2.5 μ M – 10 μ M, a VPA (B) de 2.5 mM – 20 mM y a Metformina (C) en rango de 6.25 mM – 50 mM. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras la desviación estandar (*, $p < 0.05$).

Evaluación del efecto combinado de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina sobre la línea celular HepG2.

Para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular por tratamientos con diferentes combinaciones de los fármacos Sorafenib, VPA, Metformina de acuerdo con el modelo de relación fija o *Fixed Ratio*, las células se sembraron en una placa de 96 pozos y se dejaron incubar por 48 h. Posteriormente, los tratamientos se iniciaron por 48 h, incubando las células con diferentes combinaciones y diferentes concentraciones (Sorafenib 1, 2, 3, y 4 μ M; VPA 2, 4, 6 y 8 mM; Metformina 5, 10, 15 y 20 mM). Después, se determinó la viabilidad mediante una incubación por 3 h con resazurina. La viabilidad de las células HepG2 no se vio afectada por el tratamiento con 1 μ M de Sorafenib y 2 mM de VPA en tratamientos individuales (Figura 9A). No obstante, el tratamiento con 5 mM de

Metformina disminuyó un 25% la viabilidad celular y el efecto se vio incrementado en los tratamientos con 10 y 15 mM de Metformina, hasta alcanzar una reducción del 50% en la dosis 20 mM (Figura 9D). Con respecto al VPA, el tratamiento con 4 mM produjo una reducción de 11% sobre la viabilidad y el efecto fue dosis-dependiente como se puede observar en los tratamientos con 6 y 8 mM de VPA, en donde la viabilidad se redujo en 24% y 42%, respectivamente. En referencia a los tratamientos duales, se observaron disminuciones en la viabilidad celular desde un 18% hasta un 81% (Figura 9A y 9D). Notablemente, las combinaciones de VPA y Metformina redujeron en 44% y un máximo de 86%. Las diferentes combinaciones de Sorafenib-Metformina mostraron disminuciones desde 26% hasta un 66% en la viabilidad celular a 48 h, siendo entonces el tratamiento con menor efecto comparado contra el resto de los tratamientos duales. Cabe mencionar que todos los tratamientos duales mostraron una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) comparados contra el tratamiento individual con Sorafenib. (Figura 9C y 9D). El tratamiento con Sorafenib 2 μ M y 3 μ M redujo en 8% y 21% la viabilidad, respectivamente, y alcanzó una reducción máxima de 30% en el tratamiento con 4 μ M. Los tratamientos con la combinación Sorafenib, VPA y Metformina, mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en todos los tratamientos comparados contra el tratamiento individual con Sorafenib. Los rangos de disminución observados fueron desde un 46% hasta un 82% sobre la viabilidad celular de HepG2. Cabe destacar que la diferencia entre la primer combinación (Figura 9A) y la segunda combinación (Figura 9B) fue de 30%, mientras que al comparar la segunda combinación con el resto (Figura 9C y 9D), la diferencia no superó el 8% en la disminución de la viabilidad.

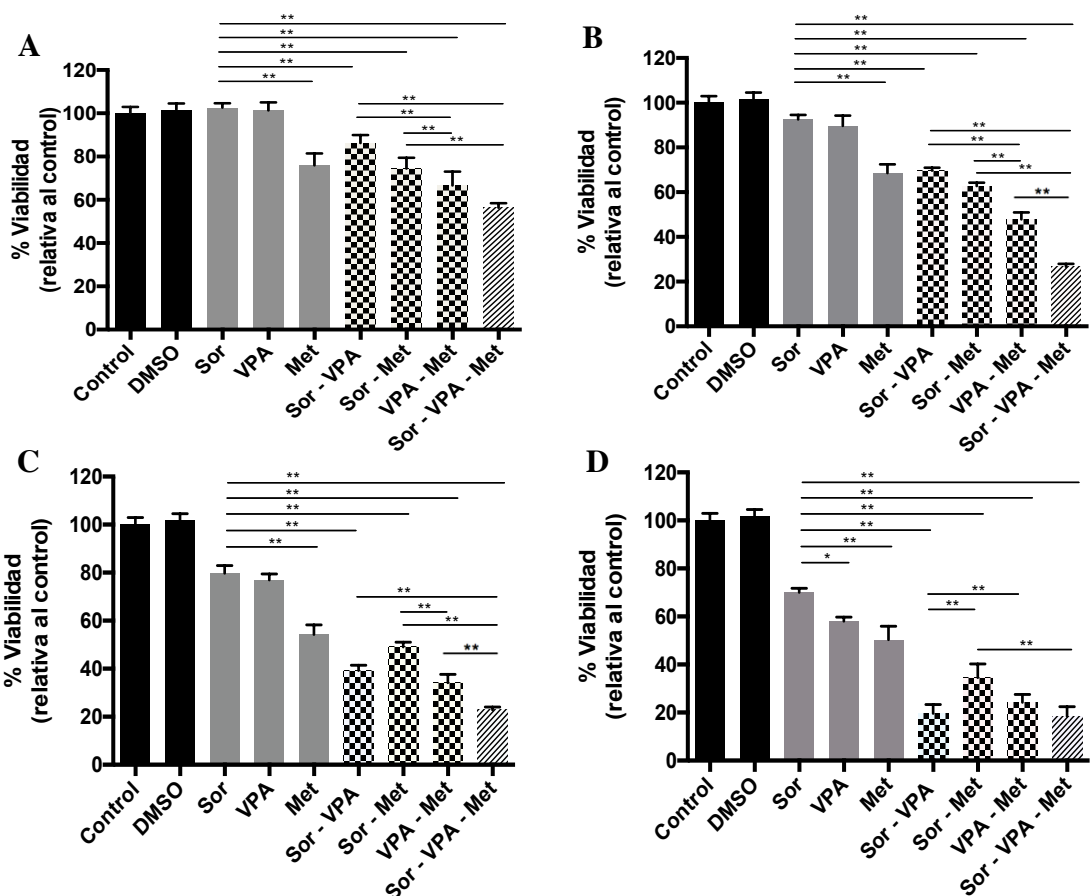


Figura 9. Efecto de la combinación de Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) en la viabilidad de la línea celular HepG2. Se evaluó la viabilidad celular por efecto del tratamiento con distintas concentraciones de Sorafenib, VPA y Metformina de acuerdo con el modelo “Fixed Ratio” (García-Fuente *et al.*, 2018), en tratamiento individual (barras grises), en combinaciones duales (barras cuadriculadas) y en combinaciones triples (barras ashuradas). El tratamiento control corresponde a células sin tratamiento y el vehículo corresponde al tratamiento con DMSO. Panel A: Células expuestas a Sorafenib (1 μ M), VPA (2 mM) y Metformina (5 mM) en tratamientos individuales o sus combinaciones. Panel B: Células expuestas a Sorafenib (2 μ M), VPA (4 mM) y Metformina (10 mM) en tratamiento individual y sus combinaciones. Panel C: Células expuestas a Sorafenib (3 μ M), VPA (6 mM) y Metformina (15 mM) en tratamiento individual y sus combinaciones. Panel D: Células expuestas a Sorafenib (4 μ M), VPA (8 mM) y Metformina (20 mM) en tratamiento individual o sus combinaciones. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras la desviación estandar. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$)

Con la finalidad de determinar la naturaleza del efecto producido sobre la viabilidad celular a causa del tratamiento triple, se realizó un análisis con el método Chou-Talalay con el software CompuSyn (Figura 10), mismo que proporciona el índice de combinación (CI), el cual un valor <1 indica sinergismo, 1 indica un efecto aditivo y >1 muestra efectos antagónicos.

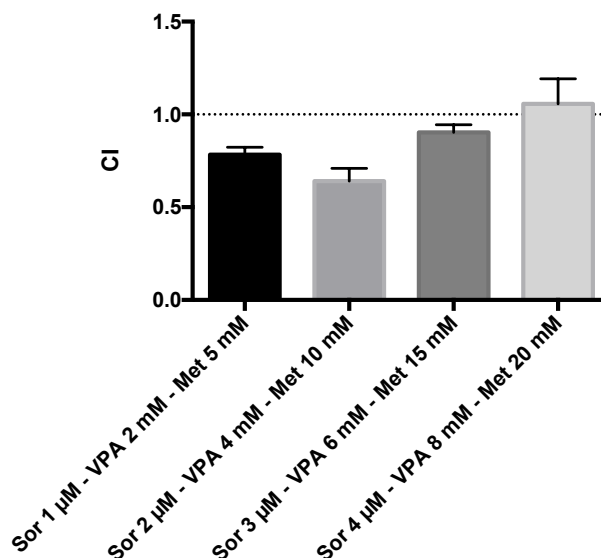


Figura 10. Determinación de efectos sinérgicos en la combinación triple de los fármacos. Células HepG2 fueron expuestas al tratamiento combinado con Sorafenib (Sor)-VPA- Metformina (Met) por 48 h. Se determinó el índice de combinación (CI) mediante la fórmula de la ecuación del efecto medio.

Con base los resultados anteriores, se seleccionó la concentración de trabajo 2 µM Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM de Metformina para el resto de los experimentos.

Para determinar la viabilidad celular por efecto de la combinación de los fármacos en una línea de hepatocarcinoma murino y en una línea celular no cancerosa, las células Hepa1 y fibroblastos dérmicos humanos fueron expuestos por 48 h al tratamiento con 2 µM Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM de Metformina, y posteriormente incubadas durante 2 horas con rezasurina.

Con respecto a las células Hepa1 (Figura 11A), el tratamiento individual con VPA mostró el mayor efecto sobre la viabilidad al disminuir en 26%; el tratamiento con Met redujo un 18% y el tratamiento con Sorafenib no tuvo ningún efecto. La exposición a VPA-Metformina aminoró en 52% la viabilidad y el resto de las combinaciones duales mermaron un 42% (Sorafenib-VPA) y 27% (Sorafenib-Metformina). El tratamiento con Sorafenib-VPA-Metformina provocó una reducción del 74% en la viabilidad de la línea Hepa1. En el caso de los fibroblastos (Figura 11B), se observó que el tratamiento individual con Sorafenib y Metformina disminuyó la viabilidad en 20% y 24%,

respectivamente, mientras que el tratamiento con VPA disminuyó un 9%. El tratamiento con Sorafenib-VPA mostró el mayor efecto entre las combinaciones duales, al disminuir un 46% la viabilidad, mientras que los tratamientos con Sorafenib-Metformina y VPA-Metformina redujeron la viabilidad en 42% y 29%, respectivamente. Para el tratamiento con la combinación triple, la viabilidad se redujo en 49%.

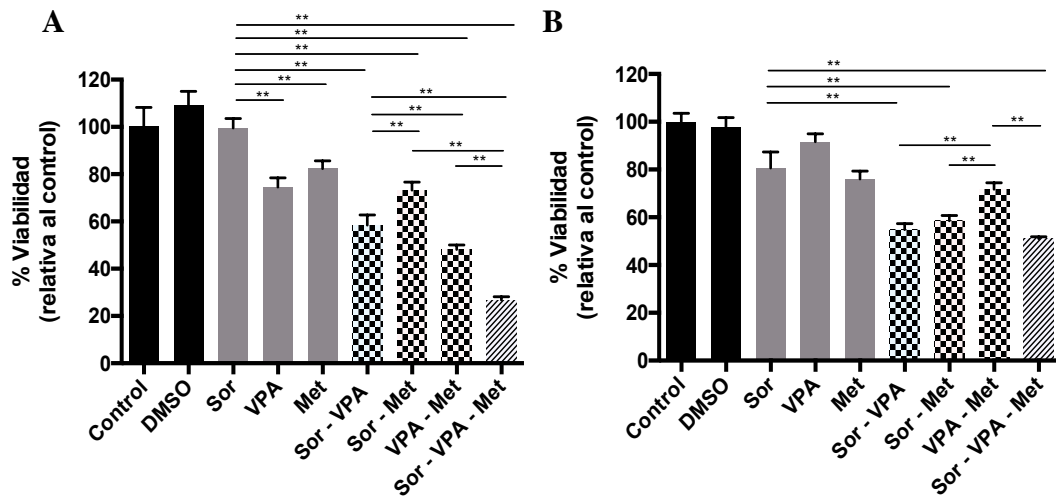


Figura 11. Efecto de la combinación de Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) en la viabilidad de las líneas celulares Hepa1 y fibroblastos dérmicos humanos.

Se evaluó la viabilidad celular por efecto del tratamiento con distintas concentraciones de Sorafenib, VPA y Metformina en tratamiento individual (barras grises), en combinaciones duales (barras cuadrículadas) y en combinaciones triples (barras ashuradas). El tratamiento control corresponde a células sin tratamiento y el vehículo corresponde al tratamiento con DMSO. Panel A Células de hepatocarcinoma murino (Hepa1) expuestas a Sorafenib (2 μ M), VPA (4 mM) y Metformina (10 mM) en tratamiento individual y sus combinaciones: Panel B: Fibroblastos dérmicos humanos expuestos a Sorafenib (2 μ M), VPA (4 mM) y Metformina (10 mM) en tratamientos individuales o sus combinaciones. (* p <0.05, ** p <0.01)

Evaluación de la capacidad migrativa por efecto de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina.

Para establecer el efecto del tratamiento por 48 h con una combinación de los fármacos sobre la capacidad migrativa, las células se sembraron y se realizó un ensayo de lesión sobre la monocapa. Las células fueron fotodocumentadas hasta 48 h (Figura 12). Las imágenes fueron procesadas en el programa ImageJ y analizadas con la herramienta Wound Healing size tool.

El porcentaje de cierre de lesión (Figura 13) del grupo suplementado con 5% de SFB mostró un cierre de 14.86% mismo que fue prácticamente abatido al adicionar la combinación de Sorafenib-VPA -Metformina, pues el valor observado fue de 0.05%. Debido a la presencia de factores mitogénicos contenidos en el SFB, se cultivaron las células en DMEM libre de suero para reducir el fondo creado por la proliferación celular. Se determinó un porcentaje de cierre del 1.74%, el cual fue reducido a -0.27% al añadir la combinación de los fármacos. El grupo suplementado con 10% SFB más mitomicina mostró valores de 2.32% en el cierre de lesión, los cuales se redujeron al -3.44% al añadir el tratamiento combinado.

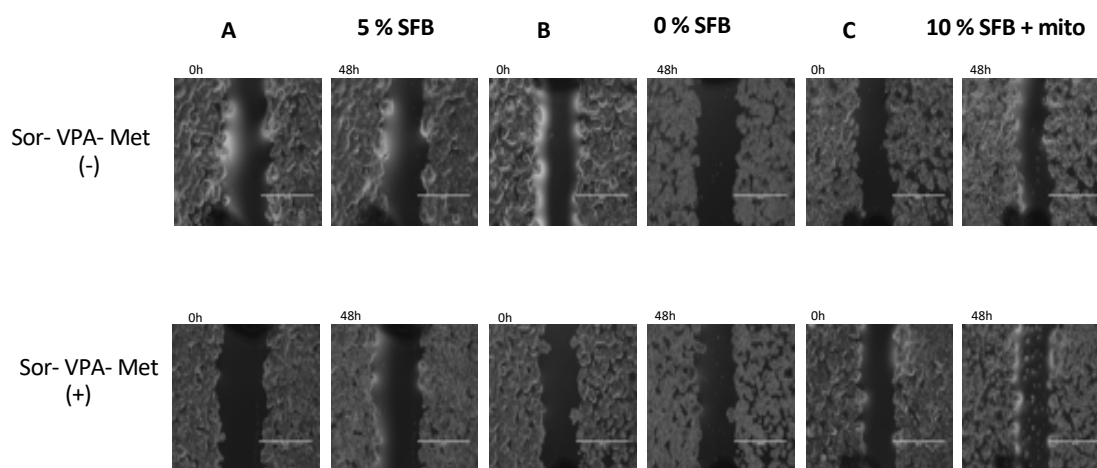


Figura 12 Imágenes representativas del ensayo de lesión en células HepG2 expuestas al tratamiento farmacológico por 48 h. Se sembraron células HepG2 con diferentes concentraciones de suero fetal y fueron tratadas con una combinación de los fármacos Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met). Panel A: Células cultivadas en DMEM suplementado con 5% SFB y tratadas con la combinación de los fármacos (2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA, 10 mM Metformina) durante 48 h. Panel B: Células cultivadas en DMEM 0% SFB y tratadas con la combinación de los fármacos (2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA, 10 mM Metformina). Panel C: Células cultivadas en DMEM 10% SFB, suplementado con mitomicina C (10 μ g/mL – 2h) y tratadas con la combinación de los fármacos (2 μ M Sorafenib, 4 mM

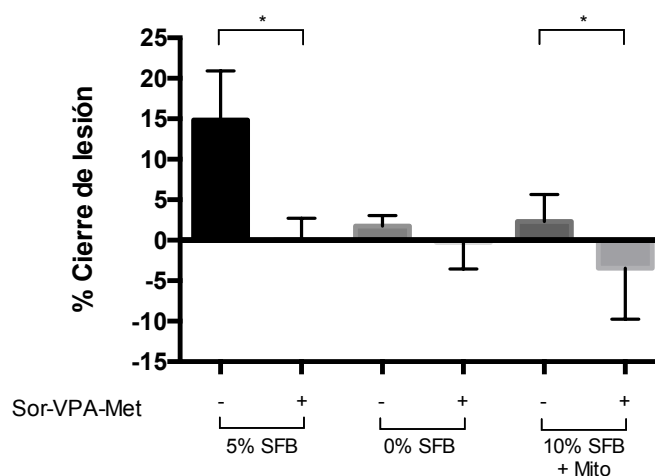


Figura 13. Efecto de una combinación de los fármacos Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) por 48 h en la migración de células HepG2. Se determinó el porcentaje de migración celular mediante un ensayo de lesión en células tratadas con diferentes concentraciones de SFB (5%, 0% y 10%) y una combinación de los fármacos (2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA, 10 mM Metformina). El grupo tratado con 10% SFB se incubó por 2 h con mitomicina C para suprimir la proliferación. Se tomaron imágenes en lapsos de 48 h. y se realizó el análisis mediante el programa ImageJ acoplado a la herramienta Wound Healing Assay size tool (*, $p < 0.05$).

Evaluación del potencial angiogénico por efecto de los fármacos Sorafenib, VPA y Metformina.

Con la finalidad de observar el efecto sobre el potencial angiogénico por efecto del tratamiento combinado, se realizó una extracción de RNA con el reactivo RNazol y el RNA fue sometido a una reacción RT-qPCR para evaluar la expresión del gen *VEGF*. Como control endógeno se utilizó el gen *GAPDH*. El RNA extraído fue sometido a evaluaciones de pureza mediante las relaciones de A260/230 y A260/280 y en todos los tratamientos se obtuvieron valores superiores a 1.8 para ambas relaciones. La evaluación de la integridad del RNA se realizó mediante una migración electroforética en gel 1% agarosa (Figura 14), en el cual se observaron las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

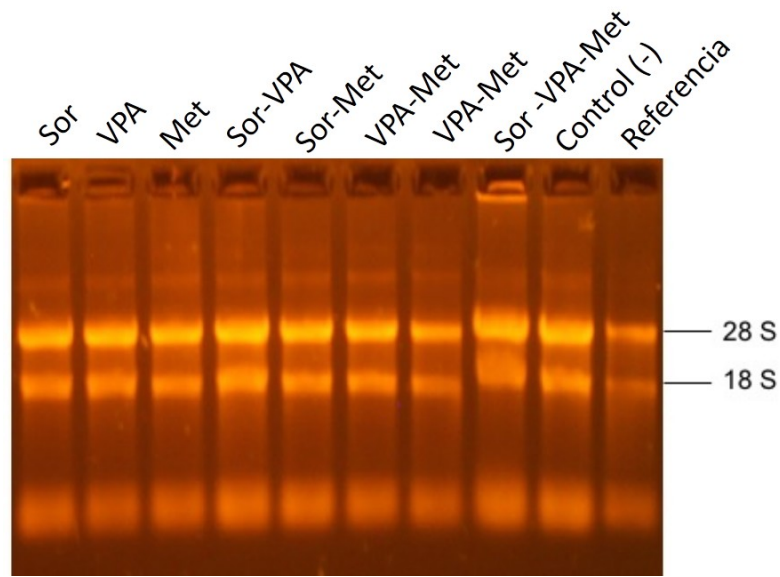


Figura 14. Imagen representativa de gel mostrando la integridad del RNA. Se realizó la extracción del RNA de los grupos tratados individualmente con Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met), en combinaciones duales o triples. El grupo control corresponde a células sin tratamiento y el vehículo utilizado fue DMSO. Se observan las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S ribosomales.

Posteriormente, mediante una PCR dirigida al gen 18S ribosomal se evaluó la funcionalidad del RNA. El cDNA obtenido en la reacción de retrotranscripción se usó como templado para la amplificación de la subunidad 18S ribosomal. Los productos fueron sometidos a una separación electroforética en gel de agarosa 1% y teñidos con

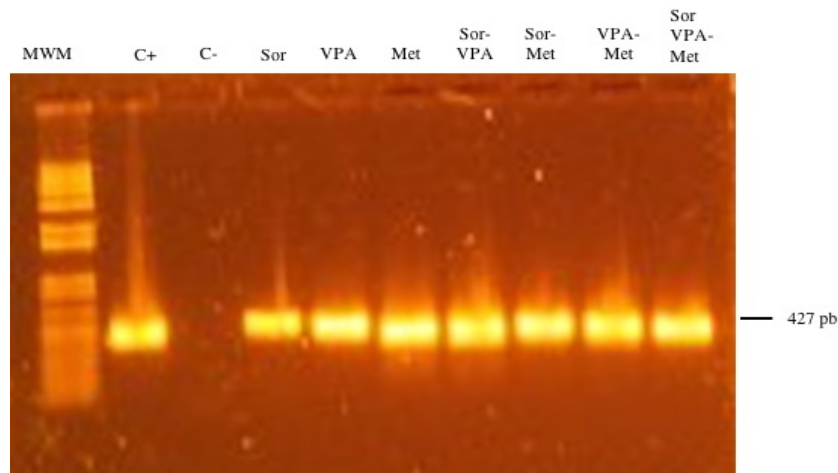


Figura 15. Electroforesis representativa de la evaluación de la funcionalidad del cDNA. El cDNA obtenido en la reacción de retrotranscripción se usó como templado de amplificación en una PCR dirigida hacia el gen 18S ribosomal y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1%. Se observa la amplificación de un fragmento de 427 pb. El control negativo (C-) corresponde al mix de PCR sin templado. Se incluye uno de los triplicados de cada tratamiento farmacológico con Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met). El grupo control (DMEM) y el grupo vehículo (DMEM-DMSO) no se muestran.

GelRed® (Figura 15), donde se observó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 427 pb.

A continuación, se realizó una dilución 1:128 del cDNA de cada uno de los tratamientos y fue utilizada en una qPCR con sondas TaqMan para la cuantificación de la expresión de los genes *VEGF* y *GAPDH*, el último utilizado como control endógeno. Los resultados fueron evaluados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y graficados como unidades relativas de expresión. Se observó que el tratamiento individual con Sorafenib disminuye la expresión de *VEGF* (0.44 unidades relativas) de forma significativa ($p < 0.05$) al comparar contra el tratamiento con DMSO (1.21 unidades relativas) (Figura 16). En el caso del tratamiento individual con VPA o Metformina o sus combinaciones, se observó una tendencia al incremento en la cantidad de transcrito, inclusive este incremento es significativo al comparar contra el tratamiento con Sorafenib. Notablemente en el tratamiento triple se observó la reversión de los niveles de expresión (1.19 unidades relativas) a valores semejantes a los resultantes por el tratamiento con DMSO. Cabe mencionar que todos los tratamientos mostraron valores elevados significativamente cuando fueron comparados con el tratamiento con Sorafenib.

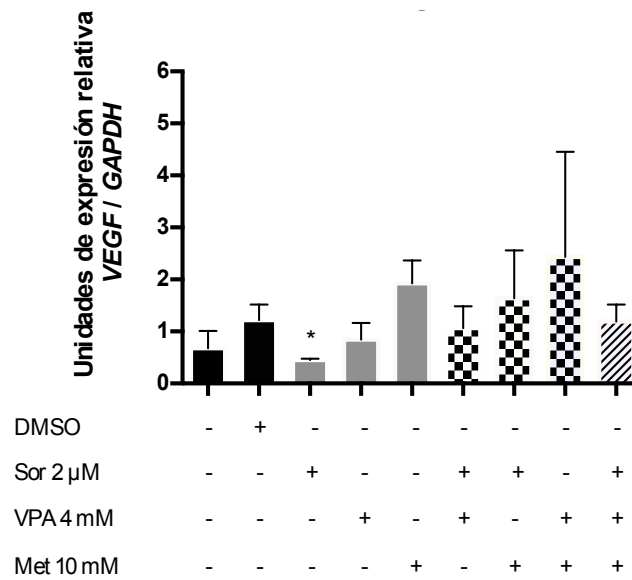


Figura 16. Expresión relativa de *VEGF/GAPDH*. Células HepG2 fueron tratadas con Sorafenib (Sor), VPA y Metformina (Met) en tratamiento individual (barras grises), combinaciones duales (barras cuadriculadas) la combinación de Sorafenib, VPA y Metformina (barras ashuradas) durante 48 h. Posteriormente se realizó la cuantificación de la expresión de *VEGF* mediante un ensayo de qPCR y se empleó el gen *GAPDH* como control endógeno. Los resultados fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. (* $p < 0.05$)

Discusión

Con la finalidad de establecer la IC₅₀ a 48 h para todos los fármacos, las células HepG2 fueron expuestas a tratamiento con diferentes concentraciones de los fármacos y los resultados fueron graficados como curvas dosis-respuesta. Estos resultados fueron analizados mediante el método de regresión logística de 4 parámetros (Sebaugh, 2011). Se determinó que el tratamiento individual con Sorafenib, VPA o Metformina disminuye la viabilidad celular en forma dosis-dependiente (Figura 6).

El IC₅₀ estimado para Sorafenib fue de 5.89 μ M. Previamente se han reportado valores de 8.6 μ M (Singh *et al.*, 2016) y 6 μ M (Wei *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017) en modelos celulares de HCC expuestos por 48 h a Sorafenib. El IC₅₀ para VPA fue estimado en 12.29 mM. Otros autores han identificado valores en HepG2 de 5 μ M (Sanaei y Kavooosi 2019) y 5.1 mM (Zhu *et al.*, 2017) a 48 h. El tratamiento con Metformina mostró un IC₅₀ de 23.37 mM. Rastegar y col. (2018) determinaron que el tratamiento con 10 mM de Metformina disminuye ~50% la viabilidad celular, mientras que Cai y col. (2013) determinaron efectos similares por efecto de la exposición a 48 h.

Las diferencias observadas podrían deberse a numerosos factores. Ejemplos de estos son las condiciones de cultivo, confluencia inicial del cultivo e inclusive variaciones entre los lotes de las líneas celulares o los fármacos. Otro factor a considerar es el método de determinación de viabilidad y las variaciones implícitas en el mismo (Niepel *et al.*, 2017). El número de pase celular previamente ha sido descrito como un factor modificador de la respuesta a los fármacos debido a diferencias en el perfil de expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos y acumulación de inestabilidad genómica en las subclonas (Ben-David *et al.*, 2018). Una diferencia claramente identificada entre nuestro trabajo y otros en la literatura, fue el tiempo de inicio de los tratamientos después de la siembra. Las células fueron tratadas 48 h después de haber sido sembradas debido a que previamente Vega-Benedetti y col. (2018) reportaron que el tiempo de duplicación de la línea celular HepG2 cultivada en medio DMEM es de 27 h. Estos autores observaron un incremento de 0 a 48 h en la cantidad de células de las diferentes líneas de HCC evaluadas.

Notablemente, la tendencia al incremento en el número de células de todas las líneas de HCC probadas, se vio acentuada a partir de las 48 h, manteniendo esta tendencia hasta las 96 h totales del experimento. Este incremento podría corresponder a la fase logarítmica de crecimiento celular.

Referente a la proliferación, se observó una disminución dosis dependiente (Figura 8) por efecto del tratamiento farmacológico. Este efecto es concomitante con lo previamente reportado en ensayos sobre líneas celulares de HCC expuestas a concentraciones de Sorafenib 2 μ M a 20 μ M, las cuales mostraron efectos antiproliferativos dependientes de la dosis (Li *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2015). En referencia al VPA, Armeanu (2005) realizó tratamientos sobre diferentes modelos de HCC incluyendo HepG2 y determinó que los efectos antiproliferativos son observables a partir de concentraciones superiores a 1.7 mM. El tratamiento con Metformina (Figura 8) mostró un arresto celular a partir de la concentración 6.25 mM, estos resultados son concordantes con los reportados por Ferreti y col. (2019), quienes observaron que los efectos antiproliferativos de Metformina son evidentes a partir del tratamiento con 5 mM.

Previamente el Sorafenib, VPA y la Metformina han sido descritos como generadores de especies reactivas de oxígeno (Coriat *et al.*, 2012; Komulainen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

Las especies reactivas de oxígeno se han propuesto como segundos mensajeros en la regulación del ciclo celular, tanto a nivel transcripcional (Liou y Storz 2010) como a nivel de modificaciones post-traduccionales en las ciclinas (Verbon, Post, y Boonstra 2012). Las variaciones en la homeostasis del ciclo redox provocadas por moléculas generadoras de ROS son capaces de generar la disminución en la proliferación (Zhang *et al.*, 2019), conducir a la apoptosis e inclusive en bajas concentraciones pueden estimular la proliferación (Day y Suzuki 2006). Lo anterior podría explicar las disminuciones observadas por efecto del incremento en la concentración de los fármacos (Figura 7A, 7B y 7C), pero también el incremento en la proliferación observada en los tratamientos las concentraciones más bajas. Con base en lo anterior, consideramos que es necesario

realizar estudios para elucidar si existe una relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la proliferación del ciclo celular.

Con respecto a la combinación de los fármacos (Figura 9), los tratamientos con diferentes concentraciones de Metformina sobre HepG2, mostraron la mayor toxicidad de entre los grupos con tratamiento individual. Previamente se ha observado que la vía AMPK-mTOR, la cual es de importancia en procesos de proliferación y sobrevivencia, se encuentra desregulada en HCC (Ferrín *et al.*, 2020). Se ha propuesto que el mecanismo de citotoxicidad está relacionado con la afectación de los complejos mitocondriales, que como consecuencia genera la disminución del ATP y la consecuente privación energética, además de la generación de ROS mitocondriales que promueven la activación de AMPK, la cual inhibe el complejo mTOR-1 (Garza-Lombó *et al.*, 2018) y conduce a las células a la autofagia (Li *et al.*, 2017). El proceso de autofagia es activado por el desequilibrio en la homeostasis energética y conlleva la degradación de diferentes complejos y estructuras intracelulares para reestablecer el equilibrio y promover la sobrevivencia celular. En contraste con lo anterior, la autofagia también puede conducir a la apoptosis, mejor conocida como autofagia apoptótica. En el equilibrio entre las dos últimas destacan las proteínas Beclin 1, LC3 y la activación de la vía PI3K-Akt, todas las anteriores participan en la regulación entre la autofagia apoptótica y autofagia de supervivencia. Esta última ha sido relacionada con la activación de la vía PI3K-Akt (Thorburn, 2008). Estudios previos con Metformina la han relacionado con la capacidad de promover la autofagia apoptótica debido a su potencial para inhibir a Akt (Li *et al.*, 2017) y un efecto citotóxico incrementado al inhibir a LC3 (Tsai *et al.*, 2017).

En cuanto a los tratamientos individuales con Sorafenib (1 μ M, 2 μ M y 3 μ M) y VPA (2mM, 4 mM y 6 mM) se observó una citotoxicidad semejante en las tres primeras concentraciones (Figura 9A, 9B, 9C), la cual fue más evidente en el tratamiento con VPA 8mM (Figura 9D).

Con respecto a los tratamientos en combinaciones duales, todos muestran una disminución altamente significativa comparada contra el tratamiento con Sorafenib. Notablemente, la

combinación dual Sorafenib 1 μ M con 2 mM VPA y Sorafenib 2 μ M con 4 mM evidenció algunos efectos que posiblemente sean de potenciación o sinérgicos, y que posiblemente estén relacionados con los blancos moleculares en vías de señalización de los fármacos (Anexo 2). El máximo nivel de inhibición por efecto de la combinación triple se observó a partir del segundo grupo de combinaciones (Figura 9B) y hasta el último grupo de combinaciones (Figura 9D), sin embargo, el efecto se mantuvo independientemente del incremento en las concentraciones de los fármacos, esto posiblemente sea un efecto antagónico. Los efectos sinérgicos o antagónicos son el resultado de las interacciones fármaco/proteína en las diferentes vías de señalización e incluso resultado de las posibles interacciones fármaco/fármaco (Yin et al., 2014). Además, estos efectos son dependientes de las variaciones en las combinaciones entre el tiempo, concentraciones (Evstratova, Petin y Zhurakovskaya, 2018) y la relación entre las concentraciones de los fármacos empleados (García-Fuente *et al.*, 2018). Con base en lo anterior, se determinó la naturaleza de los efectos sobre la viabilidad a causa del tratamiento con Sorafenib-VPA-Metformina, mediante el método Chou-Talalay (Figura 10). Se demostró que las combinaciones Sorafenib (1, 2 y 3 μ M), VPA (2, 4 y 6 mM) y Metformina (5, 10 y 15 mM) mostraron efectos sinérgicos, mientras que la combinación Sorafenib (4 μ M), VPA (8 mM) y Metformina (20 mM) mostró efectos de naturaleza aditiva (García-Fuente *et al.*, 2018)

Para determinar el efecto del tratamiento con los fármacos en otra línea celular de hepatocarcinoma, la línea celular murina Hepa-1 fue expuesta al tratamiento durante 48 h con Sorafenib 2 μ M, 4 mM VPA y 10 mM Metformina, de forma individual, combinaciones duales y la combinación triple. En la línea Hepa-1 se observaron diferencias en la susceptibilidad a los tratamientos individuales y combinados, sin embargo, el tratamiento triple (Figura 11A) mostró una disminución en la viabilidad celular comparable a la observada en HepG2.

Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento en la viabilidad de una línea celular no cancerosa, fibroblastos dérmicos humanos fueron sometidos al tratamiento por 48 h con Sorafenib 2 μ M, 4 mM VPA y 10 mM Metformina (Figura 9B), de forma individual, combinaciones duales y la combinación triple. Notablemente, los grupos de tratamiento

con Sorafenib exhibieron mayor toxicidad, comparado contra el tratamiento con VPA y Metformina. Posiblemente esto sea debido a una particular susceptibilidad de los fibroblastos al tratamiento con Sorafenib debido a la inhibición de la vía MAPK, vía de importancia debido a la presencia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y la relación que existe entre los fibroblastos y la falla en los mecanismos de reparación de estos. Hay reportes de efectos secundarios en piel de los pacientes provocados por Sorafenib (Balagula *et al.*, 2012).

Las diferencias anteriores podrían deberse a diferencias en los niveles basales de expresión de enzimas del citocromo P450 entre las líneas celulares e inclusive a diferencias en la inducción de enzimas metabolizadoras de fármacos por efecto de la especie (Donato *et al.*, 2003; Gerets *et al.*, 2012).

El tratamiento con la combinación de los fármacos redujo notablemente la migración observada en las células HepG2 (Figura 15). Previamente Li y col . (2020) observaron una reducción en la migración de células HepG2 tratadas con Sorafenib y determinaron una reducción en las proteínas Vimentina y el factor de transcripción Snail, así como un incremento en los niveles de E-caderina, las cuales son marcadores asociados con la transición epitelio/mesenquima. Estos marcadores han sido previamente estudiados en células HepG2 expuestas por 48 h a VPA y se determinó que el fármaco promueve la transición epitelio/mesenquima e incrementa la migración aproximadamente 2.5 veces pues los niveles de E-caderina fueron disminuidos en contraste con los niveles de Vimentina y Snail (Wu *et al.*, 2016). Nuestros resultados sugieren que posiblemente el tratamiento combinado consiga abatir la migración inducida por efecto del VPA, sin embargo es necesario realizar más pruebas con los fármacos de manera individual y sus combinaciones dobles a fin de elucidar más claramente la participación de cada uno . Con respecto a la Metformina, Ferretti y col. (2019) determinaron en modelos celulares de HCC que la activación de AMPK por efecto de la Metformina contribuye al desarrollo de un fenotipo epitelial al incrementar los niveles de E-caderina y reducir los niveles de Vimentina.

Con respecto a la cuantificación del nivel de expresión de *VEGF*, se observó una disminución en la cantidad de mRNA en el grupo Sorafenib, lo anterior es concordante con los resultados obtenidos por Yao y col. (2019) quienes demostraron una reducción en la expresión de *VEGF* por efecto del tratamiento con Sorafenib. Este efecto posiblemente sea debido a la interferencia en la vía MAPK y la disminución en la actividad de la proteína ERK, la cual causa la reducción en la transcripción de *VEGF* (Zhu *et al.*, 2017). En cuanto a los tratamientos individuales con VPA o Metformina se observó un incremento en los niveles de expresión. A nuestro mejor conocimiento, no se ha establecido el efecto del VPA sobre el nivel de expresión de *VEGF* en células de cáncer hepático, no obstante en otras líneas celulares cancerosas, el VPA ha sido asociado con potencial para aminorar el nivel de expresión (Zgouras *et al.*, 2004) a través de ERK 1/2 y PI3K-Akt (Zhao *et al.*, 2016), e inclusive su acción como HDACi ha sido propuesto como un mecanismo inhibidor de HIF-1 α (Yang *et al.*, 2014), el cual es un factor transcripcional que induce al gen *VEGF* (Guo *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2014). Además, en un modelo *in vivo* implantado con células de leucemia de Kasumi, el nivel de transcrito de *VEGF* fue reducido por el tratamiento con VPA. Las diferencias observadas podrían deberse a la concentración utilizada, pues previamente ha sido establecido que el efecto del VPA sobre las HDAC es dependiente de la concentración y el tiempo, en donde a 12 h de tratamiento y 5 mM exhibe su mayor efecto sobre la acetilación de la histona 3, y a 16 h de tratamiento y 1-2 mM lo hace sobre la histona 4 (Gottlicher *et al.*, 2001). Lo anterior entonces hace evidente que los efectos de inhibición en las HDAC son dependientes de la dosis.

Estudios cuantitativos en células de HepG2 expuestas a 10 mM de Metformina han mostrado un incremento en la cantidad de transcrito de *VEGF* (Rastegar *et al.*, 2018). Nuestros resultados son concomitantes con lo reportado. Posiblemente la vía AMPK - p38 esté involucrada en este incremento, pues previamente se ha establecido que la activación de AMPK conlleva al incremento en la estabilidad del mRNA de *VEGF* (Ouchi, Shibata, y Walsh 2005). Se ha propuesto que p38 puede incrementar la estabilidad del mRNA debido a un potencial para evitar la desadenilación (Dean *et al.*, 2003). Paradójicamente, el fármaco Metformina ha sido previamente reportado con un potencial efecto anticancerígeno relacionado hacia la inhibición de la angiogénesis por los efectos que

ejerce en el eje PI3K-Akt-mTOR-HIF-1 α -*VEGF-A*; sin embargo, el efecto fue observado en ratones diabéticos obesos (Kannarkatt *et al.*, 2016).

En el tratamiento triple fue posible observar la tendencia a la disminución en la expresión de *VEGF* con respecto al tratamiento VPA-Metformina. El nivel de *VEGF* mostró valores semejantes al grupo tratado con DMSO. El mecanismo subyacente no ha sido elucidado, pero posiblemente el bloqueo por Sorafenib en la transducción de señales desde el receptor de VEGF disminuye la activación de ERK1/2, Akt y p38 (Yao *et al.*, 2013).

En este estudio fue posible determinar los efectos en la viabilidad y el potencial angiogénico de cada uno de los fármacos de forma individual y todas sus combinaciones y concentraciones utilizadas, lo cual permitió elucidar más claramente la participación de cada uno de los compuestos evaluados. Además, fue posible determinar el tipo de interacción farmacológica sobre la viabilidad y el cambio en la misma por efecto de las variaciones en las concentraciones. Este trabajo provee además información complementaria del efecto en la viabilidad en dos modelos *in vitro* de particular interés en el tratamiento con Sorafenib y para futuros estudios en un modelo *in vivo*. Los resultados obtenidos por efecto de los fármacos estudiados están libres de interacción o inducción de enzimas metabolizadoras por efecto de la presencia de penicilina/estreptomicina en el medio de cultivo. Aunado a lo anterior, el inicio de los tratamientos a 48 h permitió determinar una disminución en la sensibilidad a los fármacos al comparar nuestros resultados con otros ensayos no mostrados, donde los tratamientos se iniciaron 24 h después de la siembra.

Debido a las limitantes técnicas del ensayo con el reactivo Azul de Alamar, es necesario recurrir a ensayos adicionales y complementarios como la citometría de flujo para confirmar la disminución de la proliferación por efecto de los fármacos, así también para determinar el mecanismo de muerte inducido en las células. Con respecto a la citotoxicidad mostrada por las concentraciones utilizadas en el ensayo de lesión y la morfología celular, no es posible discriminar con certeza la disminución de la capacidad migrativa, por lo que es necesario abordar cualitativamente este efecto en un ensayo de

migración con cámara Transwell. Incluso incluir grupos con los fármacos individuales y las combinaciones dobles para elucidar la participación de los mismos. Además, nuestro modelo celular a pesar de haber sido reportado con perfiles de expresión del citocromo P450 comparables a los hepatocitos humanos y formar parte de los tipos de hepatocarcinoma descritos, muestra limitaciones. Por lo anterior, es posible utilizar el modelo celular HepaRG, el cual está descrito con mejor semejanza al fenómeno de hepatocarcinoma celular, y con un perfil de expresión del citocromo P450 más semejante hacia el observado en pacientes diagnosticados con esta malignidad.

Conclusión

Los tratamientos con Sorafenib, VPA o Metformina administrados de forma individual disminuyeron la viabilidad y proliferación de forma dosis-dependiente. Además, los tratamientos combinando los fármacos antes mencionados disminuyeron la viabilidad de forma dosis-dependiente, y particularmente el tratamiento con 2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM Metformina evidenció el mayor efecto sinérgico. La combinación de los fármacos, en las concentraciones mencionadas, disminuyó la viabilidad celular de un modelo de hepatocarcinoma murino en un porcentaje comparable al observado en células de hepatocarcinoma humano. Las células humanas no cancerosas expuestas al mismo tratamiento mostraron una tolerancia superior al observado en células tumorales. El tratamiento farmacológico combinado mostró una disminución en la capacidad migrativa de las células HepG2. El tratamiento farmacológico combinado no afectó la expresión en los niveles de *VEGF*, pero si se observó una disminución en la expresión de este gen en el tratamiento con Sorafenib.

Perspectivas

Para confirmar el efecto del tratamiento farmacológico combinado con 2 μ M Sorafenib, 4 mM VPA y 10 mM Metformina sobre la migración celular es necesario realizar un ensayo Transwell, el cual incluirá grupos tratamiento individuales y combinaciones duales de los fármacos. Se considera de interés evaluar si existe una relación entre la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocadas por los fármacos y la inducción del arresto celular, a través de sondas sensibles a ROS y marcadores del ciclo celular cuantificados por citometría de flujo. Además, es deseable evaluar el ciclo celular y las vías de muerte celular por efecto de este tratamiento farmacológico combinado por medio de citometría de flujo. También, es importante la evaluación de las vías de señalización de los blancos moleculares de estos fármacos por medio de inmunodetección en fase sólida usando anticuerpos específicos. Por último, una vez analizado los resultados obtenidos de los ensayos experimentales propuestos, se podría evaluar el efecto del tratamiento farmacológico combinado en un modelo animal por medio de un xenotransplante luminiscente.

Literatura citada

Armeanu, S., Pathil, A., Venturelli, S., Mascagni, P., Weiss, T.S., Göttlicher, M., Gregor, M., Lauer, U.M., Bitzer, M., 2005. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *Journal of Hepatology* 42, 210–217.

Balagula, Y., Wu, S., Su, X., Feldman, D.R., Lacouture, M.E., 2012. The risk of hand foot skin reaction to pazopanib, a novel multikinase inhibitor: a systematic review of literature and meta-analysis. *Investigational new drugs* 30, 1773–1781.

Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., Tang, H., Oren, Y., Hinohara, K., Strathdee, C.A., Dempster, J., Lyons, N.J., Burns, R., Nag, A., Kugener, G., Cimini, B., Tsvetkov, P., Maruvka, Y.E., O'Rourke, R., Garrity, A., Tubelli, A.A., Bandopadhyay, P., Tsherniak, A., Vazquez, F., Wong, B., Birger, C., Ghandi, M., Thorner, A.R., Bittker, J.A., Meyerson, M., Getz, G., Beroukhi, R., Golub, T.R., 2018. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* 560, 325–330.

Cai, X., Hu, X., Cai, B., Wang, Q., Li, Y., Tan, X., Hu, H., Chen, X., Huang, J., Cheng, J., Jing, X., 2013. Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo. *Oncology reports* 30, 2449–2457.

Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I.J., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko, R., Zeskind, B., Risso, S., Kagan, E., Papapetropoulos, S., Grossman, I., Laifenfeld, D., 2018. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British journal of pharmacology* 175, 168–180.

Chen, J.C.H., Chuang, H.Y., Liao, Y.J., Hsu, F.T., Chen, Y.C., Wang, W.H., Hwang, J.J., 2019. Enhanced cytotoxicity of human hepatocellular carcinoma cells following pretreatment with sorafenib combined with trichostatin A. *Oncology Letters* 17, 638–645.

Cheng, A.-L., Guan, Z., Chen, Z., Tsao, C.-J., Qin, S., Kim, J.S., Yang, T.-S., Tak, W.Y., Pan, H., Yu, S., Xu, J., Fang, F., Zou, J., Lentini, G., Voliotis, D., Kang, Y.-K., 2012. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma according to baseline status: subset analyses of the phase III Sorafenib Asia-Pacific trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48, 1452–1465.

Choi, J.M., Oh, S.J., Lee, S.Y., Im, J.H., Oh, J.M., Ryu, C.S., Kwak, H.C., Lee, J.-Y., Kang, K.W., Kim, S.K., 2015. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of pharmacological research* 38, 691–704.

Chou, T.-C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* 58, 621–681.

- Coriat, R., Nicco, C., Chéreau, C., Mir, O., Alexandre, J., Ropert, S., Weill, B., Chaussade, S., Goldwasser, F., Batteux, F., 2012. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 11, 2284–2293.
- Courtney, R., Ngo, D.C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S.M., Karagiannis, T.C., 2015. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular biology reports* 42, 841–851.
- Day, R.M., Suzuki, Y.J., 2006. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. Dose-response : a publication of International Hormesis Society 3, 425–442.
- De Mattia, E., Cecchin, E., Guardascione, M., Foltran, L., Di Raimo, T., Angelini, F., D'Andrea, M., Toffoli, G., 2019. Pharmacogenetics of the systemic treatment in advanced hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* 25, 3870–3896.
- Dean, J.L.E., Sarsfield, S.J., Tsounakou, E., Saklatvala, J., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation. *The Journal of biological chemistry* 278, 39470–39476.
- Donato, M.T., Klocke, R., Castell, J. V, Stenzel, K., Paul, D., Gómez-Lechón, M.J., 2003. Constitutive and inducible expression of CYP enzymes in immortal hepatocytes derived from SV40 transgenic mice. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 33, 459–473.
- Evstratova, E.S., Petin, V.G., Zhurakovskaya, G.P., 2018. Synergistic effects and their potential significance for the influence of natural intensities of environmental factors on cell growth. *Synergy* 6, 1–8.
- Felisbino, M.B., Gatti, M.S., Veronezi, G.M., Tamashiro, W.M., Mello, M.L., 2013. Chromatin remodeling induced by histone deacetylase inhibitors (HDACis) in HeLa, NIH 3T3 and HepG2 cells. *Epigenetics & Chromatin* 6, P17.
- Ferretti, A.C., Hidalgo, F., Tonucci, F.M., Almada, E., Pariani, A., Larocca, M.C., Favre, C., 2019. Metformin and glucose starvation decrease the migratory ability of hepatocellular carcinoma cells: targeting AMPK activation to control migration. *Scientific reports* 9, 2815.
- Ferrín, G., Guerrero, M., Amado, V., Rodríguez-Perálvarez, M., De la Mata, M., 2020. Activation of mTOR Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 21.
- García-Fuente, A., Vázquez, F., Viéitez, J.M., García Alonso, F.J., Martín, J.I., Ferrer, J., 2018. CISNE: An accurate description of dose-effect and synergism in combination therapies. *Scientific reports* 8, 4964.

Garza-Lombó, C., Schroder, A., Reyes-Reyes, E.M., Franco, R., 2018. mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. *Current opinion in toxicology* 8, 102–110.

Gerets, H.H.J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A., 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 28, 69–87.

Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K.M., Altman, R.B., Klein, T.E., 2012. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics* 22, 820–827.

Gopaul, S., Farrell, K., Abbott, F., 2003. Effects of age and polytherapy, risk factors of valproic acid (VPA) hepatotoxicity, on the excretion of thiol conjugates of (E)-2,4-diene VPA in people with epilepsy taking VPA. *Epilepsia* 44, 322–328.

Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzl, T., 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal* 20, 6969–6978.

Guo, Y., Xiao, Z., Yang, L., Gao, Y., Zhu, Q., Hu, L., Huang, D., Xu, Q., 2020. Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep* 43, 3–15.

Kannarkatt, J., Alkharabsheh, O., Tokala, H., Dimitrov, N. V., 2016. Metformin and Angiogenesis in Cancer - Revisited. *Oncology* 91, 179–184.

Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., Claesson-Welsh, L., 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal* 437, 169–183.

Komulainen, T., Lodge, T., Hinttala, R., Bolszak, M., Pietilä, M., Koivunen, P., Hakkola, J., Poulton, J., Morten, K.J., Uusimaa, J., 2015. Sodium valproate induces mitochondrial respiration dysfunction in HepG2 in vitro cell model. *Toxicology* 331, 47–56.

Li, A., Zhang, R., Zhang, Y., Liu, Xueke, Wang, R., Liu, J., Liu, Xinkuang, Xie, Y., Cao, W., Xu, R., Ma, Y., Cai, W., Wu, B., Cai, S., Tang, X., 2019. BEZ235 increases sorafenib inhibition of hepatocellular carcinoma cells by suppressing the PI3K/AKT/mTOR pathway. *American journal of translational research* 11, 5573–5585.

Li, X., Chen, W., Liu, Kaihang, Zhang, S., Yang, R., Liu, Kairui, Li, D., Huang, Y., 2020. Oridonin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma to the Anticancer Effect of Sorafenib by Targeting the Akt Pathway. *Cancer management and research* 12, 8081–8091.

- Li, Yan, Ling, S., Song, L., Fan, N., Feng, T., Liu, L., Yang, X., Wang, M., Li, Yanling, Tian, Y., Zhao, F., Liu, Y., Huang, Q., Hou, Z., Xu, F., Shi, L., 2017. Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *International Journal of Oncology* 50, 297–309.
- Lin, S., Hoffmann, K., Schemmer, P., 2012. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Liver cancer* 1, 144–158.
- Liou, G.-Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* 44, 479–496.
- Löscher, W., Böhme, G., Schäfer, H., Kochen, W., 1981. Effect of metabolites of valproic acid on the metabolism of GABA in brain and brain nerve endings. *Neuropharmacology* 20, 1187–1192.
- Luo, D., Wang, Z., Wu, Junyi, Jiang, C., Wu, Junhua, 2014. The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma. *BioMed research international* 2014, 409272.
- Morse, M.A., Sun, W., Kim, R., He, A.R., Abada, P.B., Mynderse, M., Finn, R.S., 2019. The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 25, 912–920.
- Niepel, M., Hafner, M., Chung, M., Sorger, P.K., 2017. Measuring Cancer Drug Sensitivity and Resistance in Cultured Cells. *Current protocols in chemical biology* 9, 55–74.
- Ouchi, N., Shibata, R., Walsh, K., 2005. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circulation research* 96, 838–846.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilleams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M., 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews. Drug discovery* 18, 41–58.
- Rastegar, M., Marjani, H.-A., Yazdani, Y., Shahbazi, M., Golalipour, M., Farazmandfar, T., 2018. Investigating Effect of Rapamycin and Metformin on Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Advanced pharmaceutical bulletin* 8, 63–68.
- Raza, A., Sood, G.K., 2014. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World journal of gastroenterology* 20, 4115–4127.
- Sanaei, M., Kavooosi, F., 2019. Effect of DNA Methyltransferase in Comparison to and in Combination with Histone Deacetylase Inhibitors on Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Line. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 20, 1119–1125.

- Savitha, G., Vishnupriya, V., Krishnamohan, S., 2017. Hepatocellular carcinoma- A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9, 1276–1280.
- Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation. *Pharmaceutical statistics* 10, 128–134.
- Semela, D., Dufour, J.F., 2010. VEGF signaling, en: *Signaling Pathways in Liver Diseases*.
- Shibuya, M., 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer* 2, 1097–1105.
- Sidharthan, S., Kottilil, S., 2014. Mechanisms of alcohol-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatology international* 8, 452–457.
- Singh, A.R., Joshi, S., Burgoyne, A.M., Sicklick, J.K., Ikeda, S., Kono, Y., Garlich, J.R., Morales, G.A., Durden, D.L., 2016. Single Agent and Synergistic Activity of the “First-in-Class” Dual PI3K/BRD4 Inhibitor SF1126 with Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 15, 2553–2562.
- Sleire, L., Førde, H.E., Netland, I.A., Leiss, L., Skeie, B.S., Enger, P.Ø., 2017. Drug repurposing in cancer. *Pharmacological research* 124, 74–91.
- Stuttfeld, E., Ballmer-Hofer, K., 2009. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915–922.
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J.C., Muñoz-Camargo, C., 2020. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS one* 15, e0232565–e0232565.
- Thorburn, A., 2008. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13, 1–9.
- Thorgeirsson, S.S., Grisham, J.W., 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* 31, 339–346.
- Tsai, H.-H., Lai, H.-Y., Chen, Y.-C., Li, C.-F., Huang, H.-S., Liu, H.-S., Tsai, Y.-S., Wang, J.-M., 2017. Metformin promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma through the CEBPD-induced autophagy pathway. *Oncotarget* 8, 13832–13845.
- Vega-Benedetti, A.F., Saucedo, C.N., Zavattari, P., Vanni, R., Royo, F., Llaveró, F., Zugaza, J.L., Parada, L.A., 2018. PLAGL1 gene function during hepatoma cells proliferation. *Oncotarget* 9, 32775–32794.

Verbon, E.H., Post, J.A., Boonstra, J., 2012. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511, 1–6.

Wei, J.C., Meng, F. Di, Qu, K., Wang, Z.X., Wu, Q.F., Zhang, L.Q., Pang, Q., Liu, C., 2015. Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacologica Sinica* 36, 241–251.

Wei, M., Mao, S., Lu, G., Li, L., Lan, X., Huang, Z., Chen, Y., Zhao, M., Zhao, Y., Xia, Q., 2018. Valproic acid sensitizes metformin-resistant human renal cell carcinoma cells by upregulating H3 acetylation and EMT reversal. *BMC cancer* 18, 434.

WHO, 2018. Globocan 2018 - Home. Globocan 2018.

Wu, L., Feng, H., Hu, J., Tian, X., Zhang, C., 2016. Valproic acid (VPA) promotes the epithelial mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells via transcriptional and post-transcriptional up regulation of Snail. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 84, 1029–1035.

Yang, F.Q., Liu, M., Yang, F.P., Che, J., Li, W., Zhai, W., Wang, G.C., Zheng, J.H., Li, X., 2014. VPA inhibits renal cancer cell migration by targeting HDAC2 and down-regulating HIF-1 α . *Molecular Biology Reports*.

Yang, W., Zhao, X., Pei, F., Ji, M., Ma, W., Wang, Y., Jiang, G., 2015. Activation of the intrinsic apoptosis pathway contributes to the induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by valproic acid. *Oncology letters* 9, 881–886.

Yao, X., Ping, Y., Liu, Y., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, M., Gong, W., Chen, C., Niu, Q., Guo, D., Zhang, X., Wang, J.M., Bian, X., 2013. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. *PloS one* 8, e57188.

Yao, Y., Wang, T., Liu, Y., Zhang, N., 2019. Co-delivery of sorafenib and VEGF-siRNA via pH-sensitive liposomes for the synergistic treatment of hepatocellular carcinoma. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 47, 1374–1383.

Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C., Lai, L., 2014. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PloS one* 9, e93960.

Zgouras, D., Becker, U., Loitsch, S., Stein, J., 2004. Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 693–697.

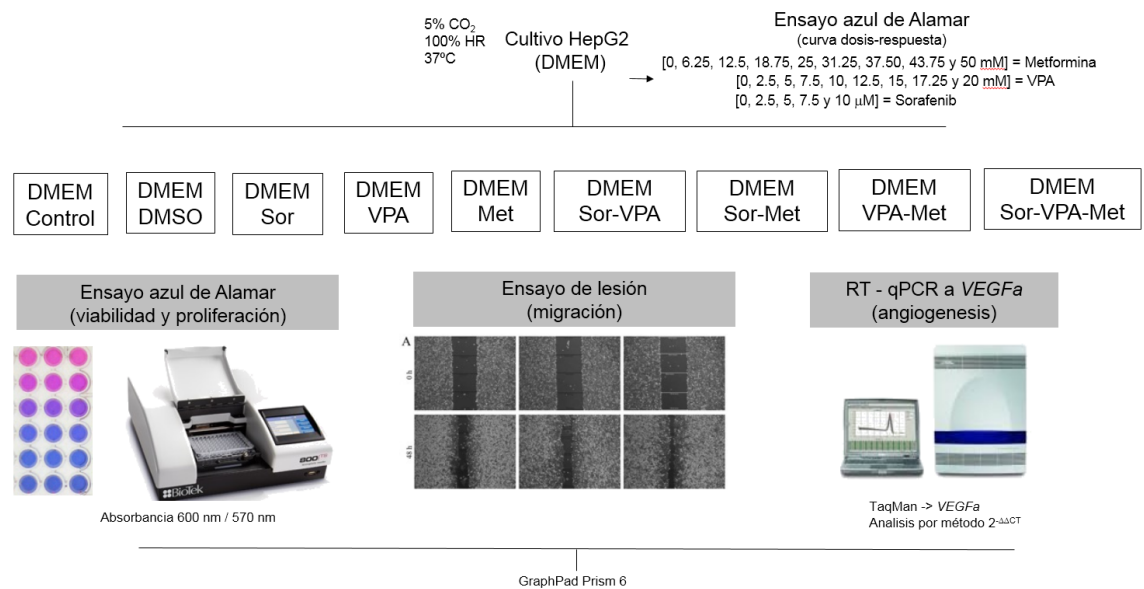
Zhang, G., He, J., Ye, X., Zhu, J., Hu, X., Shen, M., Ma, Y., Mao, Z., Song, H., Chen, F., 2019. β -Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cell death & disease* 10, 255.

Zhao, Y., You, W., Zheng, J., Chi, Y., Tang, W., Du, R., 2016. Valproic acid inhibits the angiogenic potential of cervical cancer cells via HIF-1 α /VEGF signals. *Clinical and Translational Oncology* 18, 1123–1130.

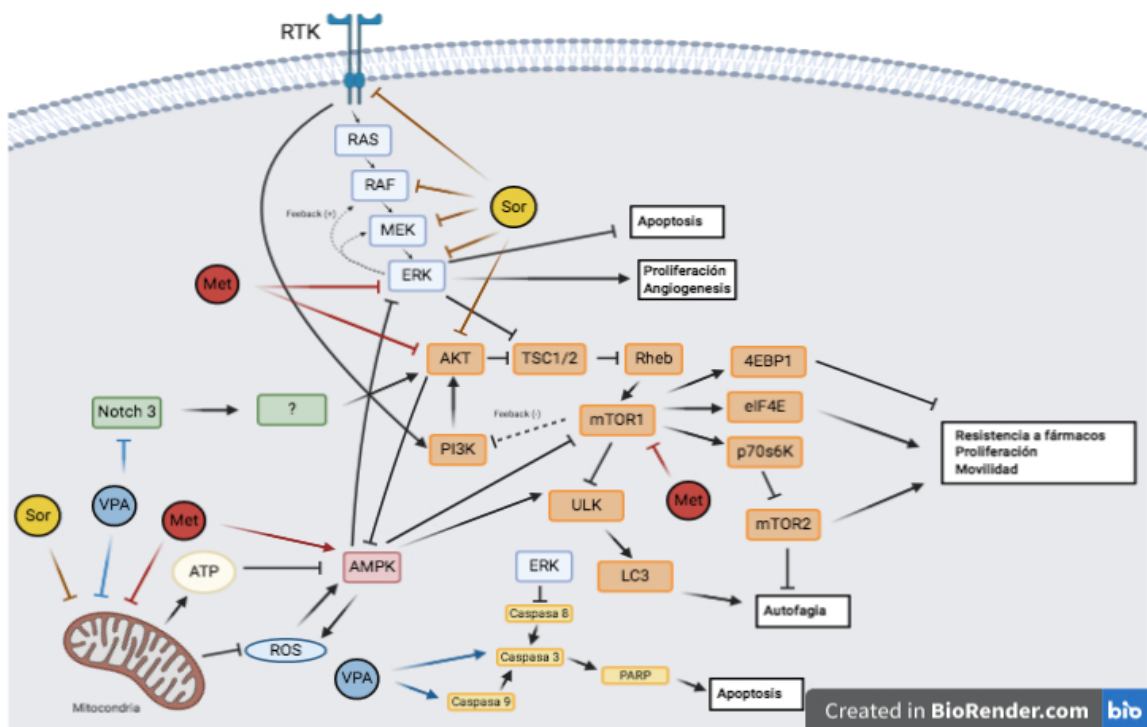
Zhu, W., Liang, Q., Yang, X., Yu, Y., Shen, X., Sun, G., 2017. Combination of sorafenib and Valproic acid synergistically induces cell apoptosis and inhibits hepatocellular carcinoma growth via down-regulating Notch3 and pAkt. *American Journal of Cancer Research* 7, 2503–2514.

Zhu, Y., Zheng, B., Wang, H., Chen, L., 2017. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacologica Sinica* 38, 614–622.

Anexo 1. Esquema experimental de este estudio.



Anexo 2. Esquema de blancos moleculares de los fármacos Sorafenib (Sor), Ácido valproico (VPA) y Metformina (Met).



RESUMEN BIOGRÁFICO

Edgar Xchel Franco Juárez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis: EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE SORAFENIB, ÁCIDO VALPROICO
Y METFORMINA EN UN MODELO CELULAR DE
HEPATOCARCINOMA**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud`

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Licenciado en Biotecnología Genómica en 2018 con reconocimiento al trabajo de
tesis.

Experiencia profesional: Maestro por horas en las cátedras de Biotecnología y Genética
en la Universidad de Montemorelos en 2018.